

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA KESSLER CHICORA

ASSOCIAÇÃO BENÉFICA E FITOPATOGÊNICA ENTRE ESPÉCIES DE *Herbaspirillum*  
spp. E PLANTAS HOSPEDEIRAS

CURITIBA

2015

VANESSA KESSLER CHICORA

ASSOCIAÇÃO BENÉFICA E FITOPATOGÊNICA ENTRE ESPÉCIES DE *Herbaspirillum*  
spp. E PLANTAS HOSPEDEIRAS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências- Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

Co-Orientador: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Rose Adele Monteiro

CURITIBA

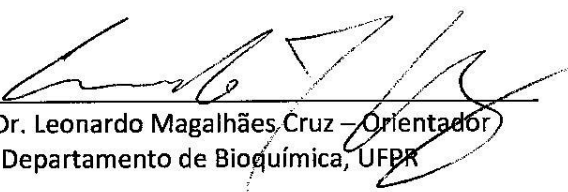
2015

## TERMO DE APROVAÇÃO


VANESSA KESSLER CHICORA

ASSOCIAÇÃO BENÉFICA E FITOPATOGÊNICA ENTRE ESPÉCIES DE  
*Herbaspirillum* spp. E PLANTAS HOSPEDEIRAS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz – Orientador  
Departamento de Bioquímica, UFPR



Dr. Eduardo Balsanelli  
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Joseph Albert Medeiros Evaristo  
Departamento de Genética, UFPR

Curitiba, 26 de março de 2015.

Dedico aos meus amados pais e meus irmãos.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Leonardo Magalhães Cruz, pelo incentivo e pela disposição para orientar o meu trabalho ao longo desses anos. Agradeço também à Professora Dra. Rose Adele Monteiro, por seu trabalho de co-orientação.

Agradeço ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN), e a todos os demais integrantes do NFN pelo apoio. Agradeço especialmente aos técnicos Valter e à D. Roseli Prado, pela amizade e dedicação despendida na realização de seus trabalhos que movem o laboratório.

Aos colegas de trabalho, especialmente aos amigos das salas 271 e 272, agradeço pela paciência, pelos momentos de descontração e pelo auxílio.

À minha família, minha fortaleza. E ao João, meu maior companheiro e braço-direito.

Ao programa de pós-graduação e Ciências – Bioquímica, pela oportunidade de realizar esse mestrado.

Agradeço, por fim, às agências financiadoras pela bolsa conferida (PIBIC-CNPq) e pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto (CNPq, Institutos do Milênio, INCT-FBN e Fundação Araucária).

## RESUMO

O gênero *Herbaspirillum* é principalmente conhecido por conter bactérias diazotróficas, que são bactérias capazes de assimilar nitrogênio atmosférico através da Fixação Biológica de Nitrogênio, podendo se associar principalmente com gramíneas, e promover seu crescimento. No entanto, o gênero inclui também bactérias que não fixam nitrogênio e que apresentam grande diversidade ecológica e fisiológica (ex., fixação de carbono, degradação de compostos fenólicos, produção de fitormônios, etc.). Atualmente o gênero *Herbaspirillum* possui 11 espécies e duas subespécies descritas, isoladas de diferentes ambientes (endofítico, rizosfera, água, solo e fezes humanas) e localizações geográficas (Brasil, Europa, Coréia, Japão e Ilhas Canárias). Os mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-bactéria de *Herbaspirillum* spp. ainda não são bem compreendidos, mas já se sabe que o Sistema de Secreção do Tipo III (SST3), a síntese de lipopolissacarídeos (LPS) e de exopolissacarídeos (EPS) estão envolvidos nessa associação. Outro mecanismo que é comumente visto na interação planta-bactéria é o Sistema *pili* Tipo IV. Foi verificado no genoma de *H. seropedicae* a presença de genes envolvidos nesse sistema, e posteriormente, análises transcriptômicas confirmaram a indução de genes desse sistema na associação do *H. seropedicae* às raízes de milho e trigo. Dessa forma, o gene *pilT*, que codifica uma ATPase capaz de retrair o *pili* e assim desenvolver um tipo de motilidade específica denominada *twitching motility*, foi deletado no *H. seropedicae*. Testes em placa de ágar foram realizados para verificar como este tipo de motilidade estaria afetada, no entanto não foram obtidas respostas conclusivas. Alguns *Herbaspirillum* spp. possuem o SST3, fator importante na colonização do arroz e de *Vigna unguiculata* por *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Dessa forma, foi verificada a associação das demais espécies de *Herbaspirillum* com a *Vigna unguiculata*, através da infiltração das culturas de bactérias nas folhas da planta. Assim, verificou-se que muitas espécies foram capazes de induzir algum tipo resposta na planta (clorose, folhas retorcidas).

Palavras-chaves: *Herbaspirillum* spp., *pili* tipo IV, *pilT*.

## ABSTRACT

The genus *Herbaspirillum* is mostly known to contain nitrogen-fixing bacteria able to assimilate atmospheric nitrogen through Biological Nitrogen Fixation and can be associated mainly with grass, and promote their growth. However, the genus also includes bacteria that do not fix nitrogen and have great ecological and physiological diversity (eg. Carbon sequestration, degradation of phenolic compounds, phytohormones production, etc.). Currently the genus *Herbaspirillum* has 11 described species, and two subspecies isolated from different environments (endophytic, rhizosphere, water, soil and human feces) and geographic locations (Brazil, Europe, Korea, Japan and the Canary Islands). The molecular mechanisms involved in plant-bacterium *Herbaspirillum* spp. are not well understood, but it is known that the secretion system of type III, the lipopolysaccharide (LPS) and exopolysaccharides (EPS) synthesis are involved in this association. Another mechanism that is commonly seen in the plant-bacteria interaction is the type IV pili System, and was found in *H. seropedicae* genome the presence of genes involved in this system, and subsequently, transcriptomic analyzes confirmed the induction of genes of this system in the *H. seropedicae* association with roots of maize and wheat. Thus, the *pilT* gene encoding an ATPase able to retract the pili and thus develop particular type of motility called twitching motility was deleted in *H. seropedicae*. Tests on agar plates were conducted to see how this type of motility was affected, however were not obtained conclusive answers. Some *Herbaspirillum* spp. have the SST3, an important factor in rice and *Vigna unguiculata* colonization by *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Thus, the association of other *Herbaspirillum* spp. was verified with the *Vigna unguiculata*, by infiltration of bacteria cultures in leaves of the plant. Thus, it was found that many species were capable of inducing some kind response in the plant (chlorosis, leaf twisted).

Key words: *Herbaspirillum* spp., type IV pili, *pilT*.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1. ESQUEMA GERAL DA ESTRUTURA SISTEMA <i>PILI</i> TIPO IV.....  | 22 |
| FIGURA 2 - ESQUEMA GERAL DA ESTRATÉGIA DE INFILTRAÇÃO EM <i>Vigna unguiculata</i> . ....   | 41 |
| FIGURA 3- ESQUEMA DA RECUPERAÇÃO DAS CÉLULAS INFILTRADAS EM <i>Vigna unguiculata</i> . ....  | 41 |
| FIGURA 4. ANÁLISE DE SIMILARIDADE ENTRE AS PROTEÍNAS PILT DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SMR1 (Hsero_0816 E Hsero_3804) E <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (PILT_PSEAE). ....  | 49 |
| FIGURA 5. ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS REGIÕES CONSERVADAS NA PROTEÍNA PILT.....   | 55 |
| FIGURA 6. ESTRATÉGIA UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DE MUTANTES COM <i>pilT</i> DELETADO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SMR1 (DETALHES DA CONSTRUÇÃO SÃO MOSTRADOS NO APÊNDICE 1). .... | 57 |
| FIGURA 7. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EVIDENCANDO O PERFIL DE RESTRIÇÃO DO pTZpilTA (LINHA 1) E DO pTZpilTB (LINHA 2).....   | 58 |
| FIGURA 8. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE MOSTRANDO A EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO A CLONADO NO VETOR pTZpilTA PARA LIGAÇÃO NO FRAGMENTO B CLONADO NO VETOR pTZpilTB. ....       | 59 |
| FIGURA 9. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EVIDENCANDO A DIGESTÃO DE COLÔNIAS OBTIDAS DA CLONAGEM DE pTZpilTAB PARA CONFIRMAÇÃO. <i>r.</i> .....                                      | 60 |
| FIGURA 10. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EVIDENCANDO COM A AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO pilTAB CLONADO. ....  | 60 |



|   |    |
|---|----|
| FIGURA 11. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EVIDENCIANDO A EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO <i>pilTAB</i> CLONADO NO VETOR PTZ57R/T PARA LIGAÇÃO NO PLASMÍDEO pSUP202. .... | 61 |
| FIGURA 12. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% MOSTRANDO A RESTRIÇÃO DE MINI-PREP CONTENDO pSUP <i>pilTAB</i> .. ....   | 61 |
| FIGURA 13. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EVIDENCIANDO A EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO CASSETE <i>sacB-Km</i> CLONADO NO VETOR pMH1701 PARA LIGAÇÃO NO PLASMÍDEO pSUP202 .....      | 64 |
| FIGURA 14. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EVIDENCIANDO A CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO pSUP <i>pilTABsacBKm</i> . ....   | 64 |
| FIGURA 15. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% MOSTRANDO AMPLIFICAÇÃO DE COLÔNIAS OBTIDAS APÓS SELEÇÃO EM SACAROSE E CANAMICINA (SEGUNDO EVENTO DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA). ....   | 65 |
| FIGURA 16. ENSAIO DE <i>TWITCHING MOTILITY</i> .....  | 67 |
| FIGURA 17. FOLHAS DE <i>Vigna unguiculata</i> INFILTRADAS COM <i>Herbaspirillum</i> spp. ....   | 70 |
| FIGURA 18 - GRÁFICO DO NÚMERO DE CÉLULAS DE <i>Herbaspirillum</i> spp. RECUPERADAS DE FOLHA DE <i>Vigna unguiculata</i> . ....  | 71 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO DOS SISTEMAS DE SECREÇÃO E SISTEMAS <i>pili</i> NO GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> . ....   | 15 |
| TABELA 2. ESPÉCIES ATUAIS DO GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS. ....   | 17 |
| TABELA 3. ESTIRPES DE BACTÉRIAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO. ....   | 29 |
| TABELA 4. COMPOSIÇÃO DO MEIO LB (LURIA BERTANI) USADO PARA CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> . ....  | 30 |
| TABELA 5. COMPOSIÇÃO DO MEIO NFBHPN-MALATO USADO PARA CULTIVO DE ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> spp. ....  | 31 |
| TABELA 6. LISTA DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS CULTIVOS CELULARES. ....   | 32 |
| TABELA 7. CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS. ....   | 32 |
| TABELA 8 - GENES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 ENVOLVIDOS NO SISTEMA <i>PILI</i> TIPO IV E ORTOLOGIA COM BANCO DE DADOS KEGG. ....                        | 43 |
| TABELA 9 - ANÁLISE PFAM DAS SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO SISTEMA <i>PILI</i> TIPO IV. ....   | 45 |
| TABELA 10. GENES ENVOLVIDOS NO <i>PILI</i> TIPO IV EM <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 E GRUPOS DE ORTÓLOGOS DO KEGG. .... | 50 |
| TABELA 11. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES USADOS PARA CLONAGEM DO GENE <i>pilT</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1. ....                                     | 58 |

## SUMÁRIO

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | INTRODUÇÃO .....   | 13 |
| 2.     | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 16 |
| 2.1.   | CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> .....                     | 16 |
| 2.2.   | SISTEMA <i>PILI</i> DO TIPO IV .....                                     | 20 |
| 2.3.   | <i>TWITCHING MOTILITY</i> .....  | 23 |
| 2.3.1  | DINÂMICA DO <i>PILI</i> TIPO IV .....                                    | 24 |
| 2.4.   | <i>PILI</i> TIPO IV DE BACTÉRIAS ASSOCIADOS A PLANTAS .....              | 24 |
| 3.     | JUSTIFICATIVA .....  | 27 |
| 4.     | OBJETIVOS .....  | 28 |
| 4.1.   | OBJETIVO GERAL .....   | 28 |
| 4.2.   | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 28 |
| 5.     | MATERIAL E MÉTODOS .....   | 29 |
| 5.1.   | BACTÉRIAS.....   | 29 |
| 5.2.   | CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS ESTIRPES DE BACTÉRIAS.....                      | 30 |
| 5.3.   | ESTOQUE DE ESTIRPES BACTERIANAS .....                                    | 31 |
| 5.4.   | ANTIBIÓTICOS.....  | 31 |
| 5.5.   | PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES .....                         | 32 |
| 5.6.   | TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA.....                                      | 33 |
| 5.6.1. | OBTENÇÃO DE DNA MOLDE, A PARTIR DE CULTURA, PARA REAÇÃO DE PCR .....     | 33 |
| 5.6.2. | AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR .....  | 33 |
| 5.6.3. | ELETROFORESE DE DNA .....  | 33 |
| 5.6.4. | DIGESTÃO DE DNA COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO .....                     | 34 |
| 5.6.5. | LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA .....                                       | 34 |
| 5.6.6. | PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....                                       | 35 |
| 5.6.7. | EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO ..... | 36 |
| 5.6.8. | PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES.....                                | 37 |

|   |    |
|---|----|
| 5.6.9. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO.....  | 37 |
| 5.6.10. TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEO PARA ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> POR CONJUGAÇÃO.....             | 37 |
| 5.6.11. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....   | 38 |
| 5.7. ENSAIO DE FENÓTIPO DE POSSÍVEIS MUTANTES DO GENE <i>pilT</i> DELETADO                                | 39 |
| 5.7.1. ENSAIO DE <i>twitching motility</i> .....  | 39 |
| 5.8. ENSAIOS <i>in planta</i> .....   | 39 |
| 5.8.1. PREPARAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Vigna unguiculata</i> .....   | 39 |
| 5.8.2. ENSAIOS DE INOCULAÇÃO POR INFILTRAÇÃO EM <i>Vigna unguiculata</i>                                  | 40 |
| 5.8.3. RE-ISOLAMENTO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS A PARTIR DAS FOLHAS  | 40 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 42 |
| 6.1. ANÁLISE GENÔMICA DOS GENES ESTRUTURAIS DO SISTEMA <i>PILI</i> TIPO IV                                | 42 |
| 6.2. COMPARAÇÃO DE MOTIVOS CONSERVADOS DA PROTEÍNA <i>PILT</i> EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ..... | 54 |
| 6.3. CONSTRUÇÃO DO MUTANTE <i>pilT</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1 .....                                | 56 |
| 7. TESTE FENOTÍPICO DOS MUTANTES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> PARA O GENE <i>pilT</i>             | 66 |
| 7.1. ENSAIOS EM <i>Vigna unguiculata</i> .....  | 68 |
| 8. CONCLUSÕES .....   | 72 |
| 9. REFERÊNCIAS .....  | 73 |
| APÊNDICE 1 .....  | 85 |
| APÊNDICE 2 .....  | 87 |

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Herbaspirillum* é historicamente conhecido pela capacidade de colonização endofítica de raízes, caules e folhas de gramíneas e por fixar nitrogênio; uma associação que pode ser benéfica (*H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingense*) (BODDEY *et al.* 1995; JAMES *et al.* 2002; ELBELTAGY *et al.* 2001; GYANESHWAR *et al.* 2002; RONCATO-MACCARI *et al.* 2003; ROTHBALLER *et al.*, 2008 ) ou, em alguns casos, fitopatogênica (*H. rubrisubalbicans*) (JAMES & OLIVARES, 1998; JAMES *et al.*, 1997; PIMENTEL *et al.*, 1991). No entanto, em anos recentes, vem sendo realizada a descoberta de diferentes espécies no gênero que ocupam diversos ambientes e que apresentam uma interessante diversidade metabólica.

Os mecanismos moleculares envolvidos na associação planta-bactéria de *Herbaspirillum* spp. ainda são pouco conhecidos, mas genes homólogos ao Sistema de Secreção do Tipo III (SST3), *pili* tipo IV, adesinas/hemaglutininas e genes envolvidos na síntese de lipopolissacarídeos (LPS) e exopolissacarídeos (EPS) foram identificados no genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (PEDROSA *et al.*, 2011). Alguns destes mecanismos foram elucidados em *Herbaspirillum* spp., como nos estudos realizados por Schmidt e colaboradores (2012), onde foi mostrado que o SST3 é requerido durante a colonização de *H. rubrisubalbicans* M1 em plantas hospedeiras, apresentado uma redução das bactérias associadas ao arroz e nenhuma hipersensibilidade em *Vigna unguiculata* quando esse sistema foi mutado. Ainda, Balsanelli e colaboradores (2010), verificaram em seus estudos que *H. seropedicae* SmR1 necessita de LPS para a colonização em milho, pois mutantes que apresentavam a síntese de LPS comprometida, apresentaram uma redução maior que 90% de bactérias aderidas à raiz de milho em comparação com a estirpe selvagem. Também, nos estudos sobre o papel do EPS na colonização das plantas por *H. seropedicae*, foi visto que os genes envolvidos no EPS eram fortemente reprimidos quando a bactéria estava associada a raiz de milho (BALSANELLI *et al.*, 2014), além da estirpe mutante *espB* não apresentar alteração na capacidade de colonização da planta em comparação com estirpe selvagem.

O *pili* do tipo IV é outro mecanismo molecular possivelmente envolvido na associação de *Herbaspirillum* spp. com a planta, e além da presença de genes homólogos que compõem esse sistema no genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (PEDROSA *et al.*, 2011) também foi visualizado a presença desse sistema em outras espécies do gênero *Herbaspirillum*, como listado na Tabela 1. Também estão listados na tabela a presença e a ausência dos sistemas de secreção do Tipo I, II, III, IV, V e VI. Em estudos realizados por Balsanelli (2013), foi observado em análise transcriptômica de *Herbaspirillum seropedicae*

SmR1 associado a raiz de milho, genes do *pili* do tipo IV expressos durante essa interação. Também, Pankievickz e colaboradores (2015) detectaram pela análise do transcriptoma por RNA-seq, a expressão de alguns genes envolvidos neste sistema em *H. seropedicae* SmR1, aderido a raízes de trigo cultivado em sistema hidropônico, como os genes *pilT* e *pilI*. Observou-se também, estruturas similares ao *pili* tipo IV desta bactéria quando associada a raiz do trigo por microscopia eletrônica de varredura.

Os genes do *pili* tipo IV são amplamente distribuídos em bactérias patogênicas Gram negativas e Gram positivas e desenvolvem um importante papel na colonização do hospedeiro e na virulência em alvos suscetíveis. O *pili* é responsável pelo *twitching motility*, um tipo de motilidade importante no deslocamento da bactéria em superfícies com baixa quantidade de água e foi observado somente nas bactérias Gram negativas (MATTICK, 2002). Em comparações realizadas com vários organismos endofíticos, Reinhold-Hurek e Hurek (2011) concluíram que a retração do pili realizada pela ATPase PilT é importante para a bactéria colonizar a superfície da raiz, e seria essa retração do *pili* responsável por realizar o *twitching motility*, pois, quando o pili é retraído a bactéria é propulsionada para frente.

Um meio de avaliar a função do *pili* tipo IV na interação planta-bactéria é através da mutagênese do gene *pilT*, uma vez que a proteína PilT codificada por ele é a responsável pela retração do *pili* e na condição de deleção do gene, deixará de exercer sua função e fará com que ocorra a hiperpiliação; ou seja, o *pili* não será retraído e será polimerizado continuamente. Com a deleção do gene será possível avaliar o impacto que será causado na associação da bactéria com a planta.

Na Tabela 1, verificamos que alguns *Herbaspirillum* spp. possuem o SST3, e no trabalho de Schmidt e colaboradores (2012) verificou-se que o SST3 é um importante fator molecular presente em *Herbaspirillum rubrisubalbicans* envolvido na colonização do arroz e de *Vigna unguiculata*, bem como da resposta de hipersensibilidade desta última pela bactéria. Dessa forma, também é importante verificar a associação das demais espécies de *Herbaspirillum* com a *Vigna unguiculata*.

TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO DOS SISTEMAS DE SECREÇÃO E SISTEMAS *pili* NO GÊNERO *Herbaspirillum*.

| ESPÉCIE                                     | SISTEMAS DE SECREÇÃO |    |     |    |   |    | <i>pili</i> |    |
|---|----------------------|----|-----|----|---|----|-------------|----|
|   | I                    | II | III | IV | V | VI | I           | IV |
| <i>H. rubrisubalbicans</i> M1               | S                    | N  | S   | N  | S | S  | S           | S  |
| <i>H. seropedicae</i> SmR1                  | S                    | N  | S   | N  | S | S  | N           | S  |
| <i>H. seropedicae</i> Os34                  | S                    | N  | S   | N  | S | S  | S           | S  |
| <i>H. seropedicae</i> Os45                  | S                    | N  | S   | N  | S | S  | S           | S  |
| <i>H. seropedicae</i> AU14040               | S                    | N  | N   | N  | S | S  | S           | S  |
| <i>H. huttiense</i> subsp. <i>putei</i> 7-2 | S                    | N  | N   | N  | S | S  | S           | S  |
| <i>Herbaspirillum</i> sp. GW103             | S                    | N  | N   | N  | S | S  | S           | S  |
| <i>H. frisingense</i> GSF30                 | S                    | N  | N   | N  | S | S  | S           | S  |
| <i>H. chlorophenolicum</i> CPW301           | S                    | N  | S   | N  | S | N  | N           | S  |
| <i>Herbaspirillum</i> sp. YR522             | S                    | N  | S   | N  | S | N  | N           | S  |
| <i>Herbaspirillum</i> sp. CF444             | S                    | N  | S   | N  | S | S  | S           | S  |
| <i>H. lusitanum</i> P6-12                   | S                    | N  | N   | N  | S | N  | N           | S  |
| <i>H. hiltneri</i> N3                       | S                    | N  | S   | N  | S | N  | N           | S  |
| <i>H. rhizosphaerae</i> UMS37               | S                    | N  | N   | N  | S | N  | N           | S  |
| <i>H. autotrophicum</i> 29984               | S                    | N  | N   | N  | S | N  | N           | S  |
| <i>H. massiliense</i> JC206                 | S                    | N  | N   | N  | S | N  | N           | S  |

1 S significa presença e N ausência do Sistema, na referência genômica.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* pertence à Família Oxalobacteraceae dentro da classe  $\beta$  do Filo Proteobacteria, apresentando células com coloração Gram negativa, geralmente com formato vibrióide, mas dependendo das condições de crescimento podem ser espiraladas, com diâmetro de aproximadamente 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$ . O comprimento das células depende do meio de cultura e varia de 1,5 a 5,0  $\mu\text{m}$ . São móveis na presença de oxigênio, usando de um a três flagelos em um ou ambos os polos. A temperatura ótima de crescimento é de 30 a 34°C e o pH ótimo de 5.3 a 8.0 (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1996; BALDANI *et al.*, 2003).

O gênero foi primeiramente relatado por Baldani e colaboradores (1986), tendo como espécie tipo o *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria fixadora de nitrogênio endofítica, inicialmente isolada de amostras de raiz e rizosfera de arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) e mais tarde de trigo (*Triticum aestivum*) e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) (BALDANI *et al.*, 1996; OLIVARES *et al.*, 1993; RODRIGUES *et al.*, 2006; OLIVARES *et al.*, 1996). Também foi verificada a presença de *Herbaspirillum seropedicae* em plantas não gramíneas, como abacaxizeiro e bananeira (CRUZ *et al.* 2001; WEBER *et al.*, 2001). *H. seropedicae* é promotora do crescimento vegetal e melhora a produtividade através da fixação nitrogênio e da produção de fitohormônios (BALDANI *et al.*, 1995). A estirpe SmR1 teve seu genoma sequenciado por Pedrosa e colaboradores (2011).

Atualmente o gênero *Herbaspirillum* é composto de 11 espécies e duas subespécies que estão listadas na Tabela 2. Em 1996, Baldani e colaboradores reclassificaram a bactéria *Pseudomonas rubrisubalbicans* como uma nova espécie do gênero *Herbaspirillum* passando a ser chamada de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. A espécie coloniza as raízes, caules, e principalmente folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e é capaz de fixar nitrogênio. Em algumas variedades de sorgo e cana-de-açúcar pode atuar como fitopatígeno (BALDANI *et al.*, 1996; JAMES *et al.*, 1998; OLIVARES, *et al.*, 1997).

*Herbaspirillum frisingense* foi adicionado ao gênero fundamentado em propriedades fisiológicas, análise filogenética do gene 16S rDNA e hibridização DNA:DNA. Associa-se a folhas, raízes e hastes de plantas forrageiras (gramíneas) como *Spartina pectinata* (Alemanha), *Miscanthus sinensis* (Alemanha), *Miscanthus sacchariflorus* (Alemanha) e *Pennisetum purpureum* (Brasil) (KIRCHHOF *et al.*, 2001). A espécie possui os genes *nif*, e em microaerofilia, fixa nitrogênio. Straub e colaboradores (2013a) sugeriram que o *H. frisingense* melhora o crescimento da planta modulando as vias de sinalização de



fitohormônios, e a estirpe GSF30 dessa bactéria teve seu genoma sequenciado (STRAUB *et al.*, 2013b).

TABELA 2. ESPÉCIES ATUAIS DO GÊNERO *Herbaspirillum* E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS.

| ESPÉCIE                                     | ESTIRPE               | LOCALIZAÇÃO     | FONTE  | CARACTERÍSTICA                                  | REFERÊNCIA  |
|---|-----------------------|-----------------|--|---|---|
| <i>H. aquaticum</i>                         | IEH 4439 <sup>T</sup> | EUA             | Água deionizada                              |   | DOBRISTA <i>et al.</i> , 2010                               |
| <i>H. autotrophicum</i>                     | SA 32 <sup>T</sup>    | Suíça           | Água de lago                                 | Autotrófico facultativo, oxidação de hidrogênio | ARGNO & SCHELEGEL, 1978; DING & YOKOTA, 2004                |
| <i>H. chlorophenolicum</i>                  | CPW301 <sup>T</sup>   | Coréia          | Solo   | Cresce em fenol e 4-chlorofenol                 | BAE <i>et al.</i> , 1996; IM <i>et al.</i> , 2004           |
| <i>H. huttiense</i> subsp. <i>huttiense</i> | 266 <sup>T</sup>      | Nova Zelândia   | Água destilada                               |   | LEIFSON, 1962; DING & YOKOTA, 2004                          |
| <i>H. huttiense</i> subsp. <i>putei</i>     | 7-2 <sup>T</sup>      | Japão           | Água de poço                                 |   | DING & YOKOTA, 2004; DOBRITSA <i>et al.</i> , 2010          |
| <i>H. massiliense</i>                       | JC206 <sup>T</sup>    | França          | Fezes humanas                                |   | LAGIER <i>et al.</i> , 2012                                 |
| <i>H. frisingense</i>                       | GSF30 <sup>T</sup>    | Alemanha/Brasil | Folha, haste e raiz de gramíneas forrageiras | Fixador de N <sub>2</sub>                       | KIRCHHOF <i>et al.</i> , 2001                               |
| <i>H. hiltneri</i>                          | N3 <sup>T</sup>       | Alemanha        | Raiz de trigo                                | L-fenilalanina como fonte de carbono            | ROTHBALLER <i>et al.</i> , 2006                             |
| <i>H. lusitanum</i>                         | P6-12 <sup>T</sup>    | Portugal        | Nódulos de feijão                            |   | VALVERDE <i>et al.</i> , 2003                               |
| <i>H. rhizosphaerae</i>                     | UMS 37 <sup>T</sup>   | Coréia          | Rizosfera do solo de alho                    |   | JUNG <i>et al.</i> , 2007                                   |
| <i>H. rubrisubalbicans</i>                  | M4 <sup>T</sup>       | Brasil          | Endofítica                                   | Fixador de N <sub>2</sub> fitopatogênico        | PIMENTEL <i>et al.</i> , 1991; BALDANI <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>H. seropedicae</i>                       | Z67 <sup>T</sup>      | Brasil          | Endofítica                                   | Fixador de N <sub>2</sub>                       | BALDANI <i>et al.</i> , 1986                                |

*Herbaspirillum lusitanum* foi classificado por Valverde e colaboradores (2003) em Portugal com base na alta similaridade da sequência do gene 16S rDNA de isolados de nódulos das raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) com outros membros do gênero *Herbaspirillum*. Inicialmente, foram vistas como bactérias fixadoras de nitrogênio pela amplificação do gene *nifD* e também pela formação de película em meio sem nitrogênio, mas, posteriormente, num estudo realizado por Weiss e colaboradores (2012) do genoma de *Herbaspirillum lusitanum*, constatou-se a ausência de genes *nif* responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio e também de genes que permitem a nodulação (*nod*). Ainda foi notada a incapacidade da bactéria de reduzir acetileno em meio semi-sólido. A ausência desses genes sugere que *Herbaspirillum lusitanum* seja uma bactéria oportunista capaz de colonizar nódulos de raiz e também outros tecidos vegetais.

*Herbaspirillum huttiense*, foi inicialmente classificada como *Pseudomonas huttiense* por Leifson (1962) isolada de amostras de água destilada originadas de Lower Hutt, na Nova Zelândia. Foi reclassificada por Ding & Yokota (2004) como o *Herbaspirillum huttiense*. No mesmo estudo, os autores também reclassificaram o *Aquaspirillum autotrophicum* (ARAGNO & SCHELEGEL, 1978) em *Herbaspirillum autotrophicum* que foi isolado da água de lago na Suíça e possui uma propriedade marcante que é a capacidade de utilizar hidrogênio como fonte de energia e dióxido de carbono como fonte de carbono. Ainda, Ding & Yokota (2004), classificaram o *Herbaspirillum putei*, uma bactéria espiralada, isolada da água de poço em Okasaka, Japão. Inicialmente, *Herbaspirillum putei* teve a presença do gene *nifH* verificada através de amplificação do gene (DING & YOKOTA, 2004), no entanto, recentemente, num estudo realizado por Dobritsa e colaboradores (2010), a presença do gene não foi constatada e o organismo foi reclassificado como *Herbaspirillum huttiense* subsp. *putei* e, o *Herbaspirillum huttiense* passou a ser denominado *Herbaspirillum huttiense* subsp. *huttiense*.

Baseado em características fenotípicas, quimiotaxonômicas e na análise da sequência do gene 16S rDNA, a bactéria capaz de degradar 4-clorofenol, anteriormente designada como *Comamonas testosteroni* (BAE *et al.*, 1996), foi reclassificada como *Herbaspirillum chlorophenolicum*. Foi isolada de sedimentos do solo coletados de um córrego próximo a uma região industrial na Coreia (IM *et al.*, 2004).

Outro membro do gênero trata-se de *Herbaspirillum hiltneri*, um isolado da superfície esterilizada de raízes de trigo (*Triticum aestivum*), que foi submetido à análise da sequência dos genes 16S rDNA e 23S rDNA, bem como a hibridizações DNA-DNA (ROTHBALLER *et al.*, 2006).

Os membros mais recentes do grupo tratam-se de: *Herbaspirillum rhizosphaerae*, isolado do solo da rizosfera de *Allium victorialis* var. *platyphyllum* na Coreia (JUNG *et al.*, 2007); *Herbaspirillum aquaticum*, isolado de água deionizada (DOBRITSA *et al.*, 2010);

*Herbaspirillum canariense*, *Herbaspirillum aurantiacum* e *Herbaspirillum soli*, três novas espécies isoladas de solo vulcânico no Tenerife, Ilhas Canárias (CARRO *et al.*, 2011). Ainda recentemente foram descritas as espécies *Herbaspirillum massiliense* (LAGIER *et al.*, 2012) e *Herbaspirillum psychrotolerans* (BAJERSKI *et al.*, 2013), a primeira isolada das fezes de um paciente senegalês saudável e a segunda isolada da superfície de solo de uma geleira em Larsemann Hills, Antártida Oriental. No entanto, recentemente em um estudo realizado por Lin e colaboradores (2013), *Herbaspirillum canariense*, *Herbaspirillum aurantiacum*, *Herbaspirillum soli* e *Herbaspirillum psychrotolerans* foram reclassificadas como pertencentes a um novo gênero denominado pelos mesmos autores como *Noviherbaspirillum*. Outro novo gênero muito próximo ao *Herbaspirillum* foi descrito por Anandham e colaboradores (2013) e denominado gênero *Paraherbaspirillum* com a espécie *Paraherbaspirillum soli*, isolada de amostras de solo da Ilha Jeju, República da Coreia. A espécie apresentou grande similaridade com *Herbaspirillum autotrophicum* e *Herbaspirillum frisingense*.

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* são principalmente conhecidas por serem capazes de se associarem superficialmente e endofiticamente com raízes, caules e folhas de gramíneas e por algumas espécies fixarem nitrogênio atmosférico e atuarem como promotores do crescimento vegetal; no entanto, como foi possível observar, ao longo do tempo, verificou-se a descrição de novas espécies isoladas de amostras de água, de solos contaminados e até mesmo de fezes humanas. (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992; BALDANI *et al.*, 1996; KIRCHHOF *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2006; LAGIER *et al.*, 2012). Ainda há mais relatos na literatura de bactérias desse gênero serem encontradas em arrozais (ELBELTAGY *et al.*, 2001; ISHII, 2011) e depósitos vulcânicos (LU *et al.* 2008) no Japão; encontrados em um córrego poluído na Coreia (KIM *et al.* 2008); no ovário de *Asobara tabida*, uma vespa endoparasita de *Drosophila*, na França. *H. rubrisubalbicans* foi encontrado associado a doença da estria mosqueada em cana-de-açúcar na China (TAN *et al.*, 2010), e, ainda na China, uma estirpe de *H. chlorophenolicum* foi isolada do lodo de uma estação de tratamento e foi visto ser capaz de degradar fluoranteno, um hidrocarboneto aromático policíclico poluente (XU *et al.* 2011). *H. huttiense* foi encontrado associado a raiz de chá (*Camellia sinensis*) (GULATI *et al.*, 2011).

*Herbaspirillum* spp. também foram encontrados em alguns isolados clínicos, primeiramente por Baldani e colaboradores (1996) como em amostras humanas de urina, fezes, secreções de feridas, amostra de trato respiratório, sangue e material gástrico. Também foram encontradas no trato respiratório de pessoas com fibrose cística na França e nos Estados Unidos, as espécies *H. huttiense*, *H. frisingense* e *H. seropedicae* (SPILKER *et al.*, 2008; CAMPANA, *et al.*, 2005; COENYE *et al.*, 2002). Em aneurisma aórtico também foram encontrados representantes do gênero (SILVA *et al.* 2006). *H. seropedicae* foi

encontrado associado a celulite (infecção) e a bacteremia em um paciente com um ferimento no membro inferior exposto à água de um canal (TAN & OEHLER, 2005). *Herbaspirillum* spp. também encontraram-se associadas a pacientes com leucemia linfoblástica aguda (CHEN *et al.*, 2010; ZIGA *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado por Marques e colaboradores (2014) a fim de comparar amostras clínicas de *Herbaspirillum* spp. com isolados ambientais do gênero, demonstraram através de testes bioquímicos, espectrometria de massa MALDI-TOF, aderência e citotoxicidade à células eucarióticas que há poucas diferenças bioquímicas entre as estirpes ambientais e humanas; ambas aderem em baixa densidade nas células HeLa e os efeitos citotóxicos são discretos, concluindo que *Herbaspirillum* spp. são bactérias oportunistas e possuem baixo potencial de virulência.

## 2.2. SISTEMA *PILI* DO TIPO IV

O *pili* de tipo IV (T4P) é um apêndice filamentoso constituído essencialmente por polímeros de pilina comumente localizado nas superfícies de diversos membros dos Filos Cianobactéria, Firmicutes e das classes  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  do Filo Proteobacteria. Portanto, estão presentes em muitas bactérias Gram negativas e foram recentemente identificados num determinado número de espécies Gram positivas (MELVILLE & CRAIG, 2013; BURROWS, 2012; CRAIG & LI, 2008). Ao mediar interações com outras células bacterianas da mesma espécie, com células eucarióticas ou com outras superfícies, o T4P desenvolve funcionalidade em diversos processos, tais como motilidade independente do flagelo (*twitching motility* e *gliding motility*) (BURROWS, 2012; MERZ, SO & SHEETZ, 2000; HENRICHSEN, 1983; BRADLEY, 1980), virulência (MERZ, SO & SHEETZ, 2000; PUJOL *et al.*, 1999; STROM e LORY, 1993), formação de biofilmes (HEYDORN *et al.*, 2002; O'TOOLE *et al.*, 1998), transferência horizontal de genes (HAN *et al.*, 2007; AVERHOFF e FRIEDRICH, 2003; AAS *et al.* 2002; DUBNAU, 1999), transporte de elétrons (REGUERA *et al.*, 2005).

T4P foi descrito pela primeira vez em *Pseudomonas aeruginosa*, em 1972 (BRADLEY, 1972a; BRADLEY, 1972b), e, subsequentemente, foi identificado em um grande número de bactérias Gram-negativas, incluindo vários agentes patogênicos humanos. Foi inicialmente considerado exclusivo de células Gram negativas, uma vez que, a arquitetura do aparelho de montagem do *pili* abrange ambas as membranas bacterianas e o periplasma (MELVILLE & CRAIG, 2013).

O T4P é extremamente fino, com espessura de aproximadamente 50 a 80 Å e comprimento normalmente maior que 1  $\mu\text{m}$ . É composto por milhares de cópias de

monômeros de pilina que são polimerizadas a partir de um conjunto de subunidades presentes nas membranas citoplasmáticas de bactérias Gram negativas. As subunidades das pilinas são chamadas de pré-pilinas; elas possuem o peptídeo principal curto carregado positivamente e possuem uma glicina na posição -1, precedendo o local de clivagem; quando clivadas originam as pilinas. Para ser clivada, a pré-pilina é translocada pela membrana interna e a sequência de sinal do lado citoplasmático da membrana é removida por uma pré-pilina peptidase ligada à membrana, chamada PilD (LAPOINTE & TAYLOR, 2000; LORY & STROM, 1997). Somente a pilina processada é competente para a polimerização, apresentando em sua unidade estrutural o N-terminal N-metilado (fenilalanina ou metionina), composto por 25 resíduos hidrofóbicos conservados, além de uma ligação dissulfeto no C-terminal (STROM & LORY, 1993).

A região N-terminal do *pili* é composta de aproximadamente 50 unidades de pilina madura forma uma  $\alpha$ -hélice estendida que dá origem ao centro do *pili* através de interações hidrofóbicas das subunidades de pilina, enquanto que o C-terminal estendido é exposto para a superfície externa do *pili* e é composto por folhas  $\beta$  (CRAIG, PIQUE & TAINER, 2004; MATTICK, 2002).

Os principais componentes que compõem o T4P estão ilustrados na Figura 1. PilA representa a pilina principal. O complexo presente na membrana externa (ausente em bactérias Gram positivas) consiste da secretina, um dodecâmero muito estável composto por subunidades PilQ e da lipoproteína PilF. PilF é responsável pela localização correta e oligomerização de PilQ na membrana externa (KOO *et al.*, 2008), enquanto que a secretina PilQ forma um canal na membrana externa para permitir que o *pili* possa ser polimerizado para fora da célula (WOLFGANG *et al.*, 2000). PilB é uma ATPase hexamérica e é capaz de converter energia química a partir da hidrólise do ATP em energia mecânica necessária para a montagem de *pili*. PilT também é uma ATPase hexamérica que necessita da hidrólise do ATP para a despolimerização do *pili* (CHIANG *et al.*, 2008; JAKOVLJEVIC *et al.*, 2008). PilC é uma proteína de membrana com dois grandes domínios citoplasmáticos, cada um contendo um conjunto de seis  $\alpha$ -hélices (KARUPPIAH *et al.*, 2010). Além das pilinas, PilB e PilC são os componentes mais facilmente identificáveis e altamente conservados em T4P (AVERHOFF & FRIEDRICH, 2003). PilD é uma pré-pilina peptidase ligada à membrana que processa a sequência de sinal nos terminais N das pilinas, e N-metila o novo terminal (STROM, NUNN & LORY, 1993).

Com base em diferenças na sequência de aminoácidos e no comprimento, as pilinas de tipo IV são divididas em duas subclasses: as pilinas de tipo IVa e as do tipo IVb. As pilinas IVa possuem a sequência líder (peptídeo de sinal) mais curta (5 a 7 aminoácidos) do que IVb (15 a 30 aminoácidos) e também apresentam a sequência madura menor, com comprimento médio de aproximadamente 150 aminoácidos em comparação com IVb que

apresenta aproximadamente 190 aminoácidos. O resíduo do N-terminal N-metilado é uma fenilalanina para as pilinas do tipo IVa, mas pode variar nas pilinas do tipo IVb. Além disso, análises de sequências indicam que as proteínas de tipo IVa compartilham maior homologia de sequência N-terminal entre elas mesmas do que com as pilinas tipo IVb, ou do que entre as pilinas tipo IVb). Fazem parte da subfamília IVa bactérias que estão presentes em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo humanos, plantas, fungos, e outros mamíferos, tais como *Neisseria* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Dichelobacter nodosus*, *Moraxella bovis*, *Moraxella nonliquifaciens*, *Eikenella corrodens*, *Azoarcus* sp., *Bdellovibrio bacteriovorus*. Na subfamília IVb, são comuns as espécies entéricas como *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* (EPEC) e *Salmonella enterica* (BURROWS, 2012; CRAIG, PIQUE & TAINER, 2004).

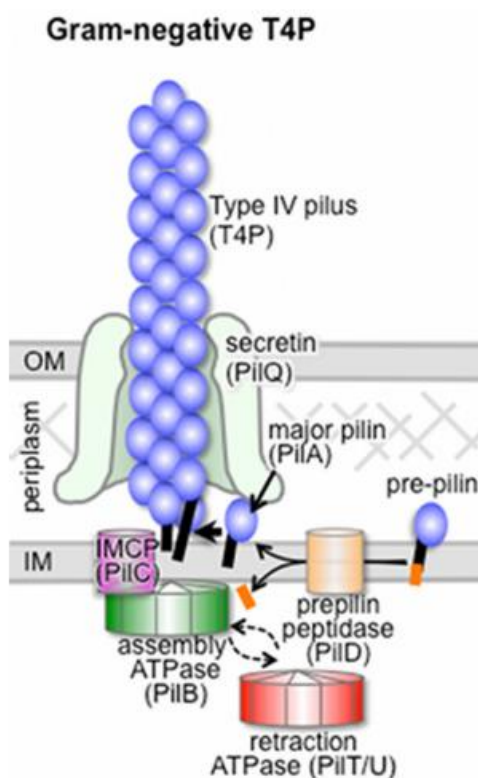


FIGURA 1. ESQUEMA GERAL DA ESTRUTURA SISTEMA *PILI* TIPO IV. PilA representa a pilina principal, PilB a ATPase de montagem, PilC a proteína do núcleo da membrana interna, PilD a pré-pilina peptidase, PilT a ATPase de retração e PilQ a secretina.

(FONTE: adaptado de MELVILLE & CRAIG, 2013).

### 2.3. TWITCHING MOTILITY

O termo *twitching motility* (“motilidade em espasmos”) foi utilizado pela primeira vez por Lautrop (1961) para descrever a motilidade de superfície independente de flagelo em *Acinetobacter calcoaceticus*. Uma motilidade semelhante foi descrita posteriormente em uma ampla gama de outras bactérias, das quais as melhores estudadas são *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Myxococcus xanthus* (MATTICK *et al.*, 2002).

Henrichsen (1972) definiu o *twitching motility* como uma espécie de translocação superficial que produz zonas de propagação em meios sólidos, em que as bordas das colônias exibiram variação de padrões micromorfológicas, apresentando movimento celular intermitente e em espasmos, sendo predominantemente isolado. Em alguns casos, tais como *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, as zonas de *twitching* sobre ágar eram tão pequenas que chegavam a ser quase invisíveis (HENRICHSEN, 1975), sugerindo que a ocorrência de *twitching motility* é variável em diferentes espécies e/ou que as condições de cultura *in vitro* são abaixo do ideal para este processo (MATTICK *et al.*, 1987; HENRICHSEN, 1983).

O *twitching motility* é mediado pelo *pili* do tipo IV, e difere do *swimming motility* (como em *E. coli* e *P. aeruginosa*) e do *swarming motility* por estes serem realizados pela rotação dos flagelos. Essa motilidade pode ocorrer tanto em superfícies orgânicas quanto em inorgânicas, como géis de ágar, células epiteliais, plásticos, vidros e metais. Além disso, é um meio das bactérias transitarem em ambientes com baixa quantidade de água ou de colonizarem superfícies hidratadas, ao invés de viverem livres em fluidos (MATTICK, 2002). Uma série de proteínas, incluindo motores moleculares, auxiliam no *twitching motility* através do processamento mecânico-químico do T4P (MATTICK, 2002; WOLFGANG *et al.*, 2000; WALL & KAISER, 1999; BRADLEY, 1980). Este processo altamente repetitivo que consiste da despolimerização rápida do T4P em pilinas e da polimerização das pilinas em T4P, pôde ser observado em *Pseudomonas aeruginosa* e *Myxococcus xanthus* através de sofisticadas técnicas microscópicas (SKERKER & BERG, 2001, SUN *et al.*, 2000).

Segundo Bradley (1980), a força motriz do *twitching motility* é derivada da retração do *pili*. Isso foi verificado com base em estudos de elétron micrografia de mutantes *twitching* e pela ligação de bacteriófagos *pili*-específicos. Dois mutantes de *P. aeruginosa* resistentes a bacteriófago, um incapaz de formar o *pili*, e ou o outro que superproduzia o *pili* (hiperpiliação) mostraram que a retração do *pili* era necessária para a infecção do fago e para a motilidade. Mais tarde estudos com mutantes capazes de hiperpiliação, mostraram ter sofrido pequenas deleções no gene *pilT*, cujo produto é uma proteína de ligação necessária para realizar a retração do *pili* e desmontagem do filamento (WOLFGANG *et al.*, 2000; MATTICK & ALM, 1995, WHITCHURCH *et al.*, 1991).

### 2.3.1 DINÂMICA DO *PILI* TIPO IV

A dinâmica do T4P possui duas etapas: 1) extensão do *pili* por polimerização, em um processo que envolve a adição das subunidades de pilina, armazenadas no reservatório na membrana interna (MORAND *et al.*, 2004), na base do *pili* (CRAIG *et al.*, 2007). 2) retração do *pili* pela despolimerização, em um processo que envolve a remoção das subunidades de pilina da base e a transferência delas para a membrana interna, ocorrendo assim, a reciclagem das pilinas (MORAND *et al.*, 2004; SKERKER & BERG, 2001). Essa dinâmica de extensão e retração de T4P é realizada por dois membros da Família de ATPases de secreção: PilB e PilT. Todas as proteínas do T4P são necessárias para a extensão do *pili* (MATTICK, 2002; WALL & KAISER, 1999), com exceção de PilT, que é especificamente envolvido na retração (MERZ, SO & SHEETZ, 2000).

A retração do *pili*, mediada pela proteína PilT, realiza a desmontagem do filamento e estima-se que esse processo ocorra a cerca de 1000 subunidades de pilina/seg. (MERZ, SO & SHEETZ, 2000; KAISER, 2000). Os mutantes PilT são incapazes de retrair o *pili*, levando a “hiperpiliação” e a perda da motilidade (WOLFGANG *et al.*, 2000; WHITCHURCH *et al.*, 1991; BRADLEY, 1980), tornando assim, a retração a base do *twitching motility*.

PilT é uma ATPase hexamérica, membro de uma grande família de ATPases que são conservadas nos sistemas *pili* Tipo IV, secreção do Tipo II e secreção do Tipo IV. PilT rodeia a base do *pili*, e é capaz de proporcionar um curso de potência rotativo axial, análogo ao que é fornecido pela porção F1 da ATPase (SATYSHUR *et al.*, 2007; KAISER, 2000), sendo dessa forma que a proteína PilT age retraindo o *pili*. Dessa maneira, o papel central do PilT é fornecer os meios para a desmontagem dos filamentos em subunidades, processo que se deve a retração. Além disso, devido ao filamento ser um polímero helicoidal, o processo de montagem e desmontagem ocorre ou pela rotação do ponto de inserção ou pela remoção da subunidade; ou o próprio filamento deve rotacionar como consequência da inserção da pilina ou da retirada do ponto fixo. Neste último caso, o *pili* pode operar como um parafuso de roquete, o que poderia criar no ponto de fixação, estresse de torção, e ser capaz de transportar macromoléculas (DNA e proteínas) para dentro e para fora da célula (MATTICK & ALM, 1995).

### 2.4. *PILI* TIPO IV DE BACTÉRIAS ASSOCIADOS A PLANTAS

O *pili* Tipo IV é uma importante estrutura envolvida em muitas interações de bactérias Gram negativas com plantas hospedeiras, sendo responsável tanto por associações fitopatogênicas, quanto benéficas (MATTICK, 2002).



Groot e colaboradores (1994), mostraram um dos primeiros estudos do envolvimento do T4P na promoção do crescimento vegetal, com a bactéria *Pseudomonas putida*, um isolado de raiz de batata, caracterizado por interagir de maneira benéfica com a planta. Em seus estudos, verificaram a presença de genes do T4P na bactéria e expressaram a proteína PilA. Dörr, Hurek e Reinhold-Hurek (1998) verificaram a importância do T4P em *Azoarcus* sp. BH72, uma bactéria endofítica, fixadora de nitrogênio associada a gramíneas, em que o *pili* mostrou-se essencial na formação do biofilme e no estabelecimento de microcolônias nas superfícies das raízes jovens de arroz. Posteriormente, verificou-se também ser necessário na propagação dentro do broto (REINHOLD-HUREK *et al.*, 2006). Na colonização endofítica, *Azoarcus* sp. requer o *twitching motility*, este fato foi demonstrado num mutante *pilT* capaz de produzir o *pili*, mas não de realizar a motilidade. Esse mutante produzia microcolônias na superfície da raiz do arroz, mas gerava uma diminuição muito grande da colonização endofítica (BÖHM, HUREK & REINHOLD-HUREK, 2007). Isso significa que a propagação da bactéria dentro da planta hospedeira é um processo ativo que envolve o *twitching motility*, como foi visto em *Xylella fastidiosa*, fitopatógeno causador da doença de Pierce em videiras e folhas queimadas em pêra, que usa essa motilidade mediada pelo *pili* Tipo IV para se deslocar para baixo no sistema vascular do hospedeiro, no sentido contrário do canal da respiração (MENG *et al.*, 2005).

Nas associações fitopatogênicas, o T4P tem aparecido desempenhando um papel limitante na colonização superficial, formação de biofilme, *twitching motility* e na virulência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrullie* e de *Ralstonia solanacearum*. *Acidovorax avenae* subsp. *citrullie* é o agente patogênico da mancha bacteriana no fruto das cucurbitáceas. Quando os genes *pilT* e *pilM* dessa bactéria foram mutados, houve redução da formação do biofilme, da virulência e do *twitching motility* (BAHAR *et al.*, 2009). *Ralstonia solanacearum*, é responsável por doenças bacterianas em mais de 200 famílias de plantas incluindo culturas de tomate, batata, amendoim e banana. Mutantes do gene *pilA*, não apresentaram *twitching motility* e mostraram uma redução na virulência sobre plantas de tomate; a auto agregação e a formação de biofilme também diminuíram (KANG *et al.*, 2002). Além disso, mutantes de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, um patógeno de arroz, mostraram que os genes envolvidos na montagem do *pili* e no *twitching motility* são necessários para a virulência (WANG *et al.*, 2007). No entanto, um estudo realizado em *X. fastidiosa* por Li e colaboradores (2007), mostrou que em mutantes sem o T4P houve uma produção maior de biofilme do que a estirpe selvagem. Nos estudos de Taguchi & Ichinose (2011), as estirpes mutantes em T4P de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, um patógeno de tabaco, mostraram redução da motilidade, formação de biofilme e da virulência ao hospedeiro de planta de tabaco. Romantschuk & Bamford (1986) e Roine e colaboradores (1998), também viram em

seus estudos iniciais que o T4P é importante nos estágios iniciais da infecção por *P. syringae*, pois o mutante desencadeia apenas doenças com sintomas fracos.

### 3. JUSTIFICATIVA

A presença de espécies diazotróficas e também fitopatogênicas dentro do gênero *Herbaspirillum* desperta grande interesse pelo grupo, e, o conhecimento dos principais mecanismos envolvidos na associação planta-bactéria permitiria muitos desenvolvimentos na área de inoculantes, onde espécies deste gênero vem sendo usadas. *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria que se associa a diversas plantas agrícolas, promovendo seu crescimento. O *pili* Tipo IV está envolvido na colonização de plantas por bactérias associativas, e genes homólogos aos genes *pil* foram identificados no seu genoma. Para determinar a possível função deste sistema na interação de *H. seropedicae* com a planta, foi construído uma estirpe mutante no gene *pilT* e sua caracterização fenotípica está em andamento.

*H. rubrisubalbicans* é capaz de causar a doença da estria mosqueada em variedades de cana-de-açúcar e causar sintomas em *Vigna unguiculata*. Estes efeitos não são observados na associação com *H. seropedicae*. O gênero *Herbaspirillum* é encontrado em diferentes ambientes (associado a planta, água e solo) e foi demonstrado que algumas espécies são capazes de colonizar raízes de arroz. Estudar o comportamento destas espécies quanto ao seu potencial fitopatogênico em *Vigna unguiculata*, também traz um grande auxílio no entendimento da interação planta-bactéria.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de colonização e fitopatogenicidade em *Vigna unguiculata* por espécies do gênero *Herbaspirillum* e o papel do Sistema *pili* do Tipo IV de *H. seropedicae* na motilidade e na interação planta-bactéria.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção de mutantes do gene *pilT*, componente do Sistema *pili* do Tipo IV, de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1;
  - Estratégia de construção do mutante com *pilT* deletado;
  - Obtenção do mutante com o gene *pilT* deletado, para o *H. seropedicae* SmR1;
  - Confirmação da deleção do gene *pilT*;
  - Ensaio de *twitching motility*.
- Inoculação das estirpes de *Herbaspirillum* spp. em *Vigna unguiculata* e avaliação do potencial fitopatogênico das espécies do gênero.
  - Inoculação das espécies de *Herbaspirillum* na planta;
  - Avaliação do potencial fitopatogênico das espécies inoculadas;
  - Re-isolamento das bactérias inoculadas;
  - Contagem das bactérias recuperadas.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. BACTÉRIAS

Para a realização deste estudo foram utilizadas as estirpes de bactérias listadas na Tabela 3.

TABELA 3. ESTIRPES DE BACTÉRIAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO.

| BACTÉRIA/ESTIRPE  | GENÓTIPO OU FENÓTIPO  | REFERÊNCIA  |
|---|---|---|
| <i>Escherichia coli</i> DH10B                               | Sm <sup>R</sup> , F' [proAB <sup>+</sup> /lacZ_M15]             | SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989                               |
| <i>Escherichia coli</i> S17.1                               | Sm <sup>R</sup> , Tra <sup>+</sup>                              | SIMON <i>et al.</i> , 1983                                  |
| <i>Escherichia coli</i> pTZpilTA                            | <i>E. coli</i> DH10B contendo o plasmídeo pTZpilTA              | Este trabalho   |
| <i>Escherichia coli</i> pTZpilTB                            | <i>E. coli</i> DH10B contendo o plasmídeo pTZpilTB              | Este trabalho   |
| <i>Escherichia coli</i> pTZpilTAB                           | <i>E. coli</i> DH10B contendo o plasmídeo pTZpilTAB             | Este trabalho   |
| <i>Escherichia coli</i> pSUPpilTAB                          | <i>E. coli</i> DH10B contendo o plasmídeo pSUPpilTAB            | Este trabalho   |
| <i>Escherichia coli</i> DpSUPpilTABsacBKm                   | <i>E. coli</i> DH10B contendo o plasmídeo pSUPpilTABsacBKm      | Este trabalho   |
| <i>Escherichia coli</i> SpSUPpilTABsacBKm                   | <i>E. coli</i> S17.1 contendo o plasmídeo pSUPpilTABsacBKm      | Este trabalho   |
| <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1                      | Z78, Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup>                         | SOUZA <i>et al.</i> , 2000                                  |
| <i>Herbaspirillum seropedicae</i> –pilT                     | <i>H. seropedicae</i> SmR1 contendo o gene <i>pilT</i> deletado | Este trabalho   |
| <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1                   | Fixador de N <sub>2</sub> , fitopatogênico                      | PIMENTEL <i>et al.</i> , 1991; BALDANI <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Herbaspirillum huttiense</i> subsp. <i>huttiense</i> 266 |   | LEIFSON, 1962; DING & YOKOTA, 2004                          |
| <i>Herbaspirillum autotrophicum</i> SA32                    | Autotrófico facultativo, oxidação de hidrogênio                 | ARAGNO & SCHELEGEL, 1978; DING & YOKOTA, 2004               |
| <i>Herbaspirillum huttiense</i> subsp. <i>putei</i> 7-2     |   | DING & YOKOTA, 2004; DOBRITSA <i>et al.</i> , 2010          |
| <i>Herbaspirillum frisingense</i> GSF30                     | Fixador de N <sub>2</sub>                                       | KIRCHHOF <i>et al.</i> , 2001                               |
| <i>Herbaspirillum chlorophenolicum</i> CPW301               | Cresce em fenol e 4-chlorofenol                                 | BAE <i>et al.</i> , 1996; IM <i>et al.</i> , 2004           |
| <i>Herbaspirillum lusitanum</i> P6-12                       |   | VALVERDE <i>et al.</i> , 2003                               |
| <i>Herbaspirillum hiltneri</i> N3                           | L-fenilalanina como fonte de carbono                            | ROTHBALLER <i>et al.</i> , 2006                             |
| <i>Herbaspirillum rhizosphaerae</i> UMS 37                  |   | JUNG <i>et al.</i> , 2007                                   |

## 5.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS ESTIRPES DE BACTÉRIAS

As estirpes S17.1 e DH10B de *Escherichia coli* foram cultivadas em meio líquido Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989), a 120 rpm de agitação e a 37° C. Para o cultivo dessas estirpes em meio sólido, utilizou-se o meio Luria-Bertani-ágar (LA), composto pelo meio LB combinado com 15,0 g/L de ágar. A composição do meio LB é descrita na Tabela 4.

As estirpes de *Herbaspirillum* spp. foram cultivadas em meio NFbHPN líquido utilizando malato como fonte de carbono (KLASSEN *et al.*, 1997) a uma temperatura de 30°C, a 120 rpm de agitação, durante aproximadamente 16 horas. No momento do inóculo foram adicionados 50,0 mmol/L de solução de fosfatos ( $K_2HPO_4$  17,8 g/L;  $KH_2PO_4$  159,5 g/L), e 20,0 mmol/L de  $NH_4Cl$ , previamente autoclavados. Para o meio NFbHPN sólido foi adicionado 15,0 g/L de ágar e para o meio semi-sólido 1,75 g/L. Na ocasião de seleção de mutantes de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, foi utilizado 10,0 mL/L de solução de fosfatos, sendo o meio denominado NFbLPN – Malato (baixo fosfato). O meio NFbHPN com malato possui a composição listada na Tabela 5.

Após o preparo dos meios de cultura, todos foram autoclavados a 120°C, 1,2 atm., durante 20 minutos.

TABELA 4. COMPOSIÇÃO DO MEIO LB (LURIA BERTANI) USADO PARA CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE *Escherichia coli*.

| ELEMENTO            | QUANTIDADE (g/L) |
|---------------------|------------------|
| Extrato de levedura | 5 g/L            |
| NaCl                | 10 g/L           |
| Triptona            | 10 g/L           |

TABELA 5. COMPOSIÇÃO DO MEIO NFBHPN-MALATO USADO PARA CULTIVO DE ESTIRPES DE *Herbaspirillum* spp.

| ELEMENTO  | QUANTIDADE               |
|---|--------------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | 17,8 g/L                 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 159,5 g/L                |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 2,0x10 <sup>-1</sup> g/L |
| NaCl  | 1,0x10 <sup>-1</sup> g/L |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 2,0x10 <sup>-2</sup> g/L |
| Ácido nitrilo triacético                            | 5,6x10 <sup>-2</sup> g/L |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 2,0x10 <sup>-2</sup> g/L |
| Biotina   | 1,0x10 <sup>-4</sup> g/L |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 1,0 g/L                  |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 1,175 g/L                |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 1,4 g/L                  |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 4,0x10 <sup>-2</sup> g/L |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 1,2x10 <sup>-1</sup> g/L |
| Malato  | 5,0 g/L                  |

### 5.3. ESTOQUE DE ESTIRPES BACTERIANAS

Para estocagem, as estirpes de *E. coli* S17.1 e DH10B foram mantidas em suspensão em solução de glicerol 50% a uma temperatura de -20°C. As estirpes de *Herbaspirillum* spp. foram estocadas em meio NFbHPN - Malato semi-sólido e sólido, a temperatura ambiente.

### 5.4. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados para a seleção das estirpes e as concentrações utilizadas estão listadas na Tabela 6.

Os antibióticos Canamicina, Estreptomicina, e Ampicilina foram dissolvidos em água ultrapura autoclavada, enquanto que Tetraciclina e Cloranfenicol em etanol.

Os antibióticos que foram dissolvidos em água ultrapura foram esterilizados por filtração através de um filtro de 0,22 µm (Millipore). As soluções estoque dos antibióticos foram armazenadas a -20°C.

TABELA 6. LISTA DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS CULTIVOS CELULARES.

| ANTIBIÓTICO    | CONCENTRAÇÃO FINAL (µg/mL) USADA PARA <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | CONCENTRAÇÃO FINAL (µg/mL) USADA PARA <i>Escherichia coli</i> |
|----------------|---|---|
| Ampicilina     | ---   | 250   |
| Canamicina     | 500   | 50  |
| Estreptomicina | 80  | ---   |
| Cloranfenicol  | 100   | 30  |
| Tetraciclina   | 10  | 10  |

### 5.5. PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Os plasmídeos utilizados neste trabalho para construção do mutante *pilT* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 estão listados na Tabela 7.

TABELA 7. CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS.

| PLASMÍDEO        | CARACTERÍSTICAS  | REFERÊNCIA                      |
|------------------|--|---------------------------------|
| pTZ57R/T         | Ap <sup>R</sup> , vetor contendo um sítio de policlonagem inserido no gene $\alpha$ - <i>lacZ</i> .          | FERMENTAS                       |
| pSUP202          | Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Mob site.  | SIMON, PRIEFFER e PUHLER, 1983. |
| pMH1701          | Contém o cassete <i>sacB</i> -Km (Km <sup>R</sup> )  | HYNES <i>et al.</i> , 1989      |
| pTZpilTA         | Contém o fragmento inicial do gene <i>pilT</i> .   | Este trabalho                   |
| pTZpilTB         | Contém o fragmento final do gene <i>pilT</i> .   | Este trabalho                   |
| pTZpilTAB        | Contém o fragmento inicial e final do gene <i>pilT</i> , ou seja, não apresenta o fragmento mediano do gene. | Este trabalho                   |
| pSUPpilTAB       | Contém o fragmento inicial e final do gene <i>pilT</i> , ou seja, não apresenta o fragmento mediano do gene. | Este trabalho                   |
| pSUPpilTABsacBKm | Contém os fragmentos inicial e final do gene <i>pilT</i> , e também o cassete <i>sacBKm</i> <sup>R</sup> .   | Este trabalho                   |



## 5.6. TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA

### 5.6.1. OBTENÇÃO DE DNA MOLDE, A PARTIR DE CULTURA, PARA REAÇÃO DE PCR

As estirpes de *Herbaspirillum* spp. foram crescidas em 5,0 mL de meio NFbHPN-Malato líquido durante aproximadamente 18 horas, a 30°C e a 120 rpm. Uma alíquota de 5,0 µL da cultura foi diluída em 45,0 µL de água ultrapura. Em seguida a mistura foi fervida durante 10 minutos. Foi utilizado 1,0 µL de cultura fervida para o sistema de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER & WILSON, 1991).

### 5.6.2. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

A reação da PCR foi realizada em um sistema contendo um volume final de 10,0 µL, sendo 1,0 µL de cultura fervida, 5,8 µL de água ultrapura estéril, 0,2 µL de oligonucleotídeos iniciadores (10 pmol/µL), 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mmol/L), 0,2 µL de dNTP (5 mmol/L), 1 µL de solução tampão de PCR (FERMENTAS®) 10 X Taq Buffer + KCl (100 mmol/L Tris-HCl pH8,8; 500 mmol/L KCl; 0,8% v/v Nonidet P40) e 10% v/v de MASOTaq (Taq DNA polimerase produzida e purificada pelo Dr. Marco Aurélio Schuller de Oliveira no Núcleo de Fixação de Nitrogênio da UFPR). O programa de amplificação consistiu das seguintes temperaturas: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 62°C durante 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e 15 segundos; e, por último, um ciclo final de alongamento a 72°C durante 5 minutos. Os tamanhos dos fragmentos resultantes da amplificação foram verificados em gel de agarose 1% após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) sob iluminação UV. Para amplificação do gene 16S rRNA foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores 27F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') e 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') e para amplificação dos fragmentos de DNA clonados, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores detalhados no item Resultados.

### 5.6.3. ELETROFORESE DE DNA

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose 1% horizontal (SAMBROOK, *et al.* 1989), utilizando para a corrida o tampão TAE 1X (Tris base 40,0 mmol/L, ácido acético 40,0

mmol/L, EDTA 2,0 mmol/L, pH 8,0). As amostras foram diluídas em tampão F.E.F Suds (azul de bromofenol 0,025%; xilenocianol 0,025%; SDS 0,1%; Ficoll® 20% em tampão T10E1) e em seguida aplicadas no gel. O tempo de eletroforese variou conforme a amostra e também conforme a voltagem utilizada. Após a eletroforese o gel foi tratado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 15 minutos e foi visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador UV com comprimento de onda de 302 nm. As imagens foram obtidas utilizando o EC3™ Imagem System - UVP BioImaging Systems.

#### **5.6.4. DIGESTÃO DE DNA COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO**

As digestões dos fragmentos de DNA amplificados por PCR foram realizadas em um sistema de reação contendo entre 1 a 5 unidades de endonucleases de restrição (INVITROGEM ou FERMENTAS), na presença de tampão e temperatura recomendados pelo fabricante, e incubados durante um período de 4 ou 16 horas, de acordo com a enzima e quantidade de DNA utilizados. Os volumes de reação variaram entre 10,0 a 50,0 µL, e aquelas enzimas que necessitavam ser inativadas, foram aquecidas durante o período requerido. Após o término da reação, as restrições foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose.

#### **5.6.5. LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA**

Para ligação de fragmentos de DNA, foi utilizado um sistema de reação para um volume final de 10,0 µL, contendo: 1,0 µL de tampão de ligação, 0,5 U de T4 DNA ligase, vetor linearizado e inserto numa razão molar de 1:5 e água ultrapura estéril suficiente para completar o volume de reação. A quantificação do fragmento de DNA e do vetor foi estimada visualmente comparando as bandas dos mesmos, obtidas no gel de agarose após a eletroforese, com as bandas referência do marcador molecular 1Kb Ladder (FERMENTAS). Com o sistema de reação finalizado, o mesmo foi incubado a 16°C durante toda a noite, e, na manhã seguinte a ligação foi inserida em *E. coli* DH10B através de eletroporação.

### 5.6.6. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

#### 5.6.6.1. Minipreparação de plasmídeos

A purificação de plasmídeos em pequena escala (miniprep) das células de *E. coli* foi realizada conforme o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989) com algumas modificações. Foram cultivados em meio LB 5,0 mL de cultura de *E. coli* DH10B, possuindo o plasmídeo de interesse, durante um período de aproximadamente 16 horas. Uma alíquota de 1,0 mL de cultura foi transferida para um tubo plástico de 1,5 mL e em seguida as células foram separadas do meio de cultivo por centrifugação a 12.100 x g durante 1 minuto. As células foram lavadas em 150,0 µL de solução GET (Tris-HCl 25,0 mmol/L pH 8,0; glucose 50,0 mmol/L; EDTA 10,0 mmol/L), centrifugadas a 12.100 x g por 1 minuto e novamente ressuspensas em 150,0 µL do mesmo tampão. Para a lise celular, adicionou-se 150,0 µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,2 mol/L) e a mistura foi homogeneizada cuidadosamente por inversão. Em seguida, 150,0 µL de acetato de potássio (3 mol/L, pH 4,8) foram adicionados para que houvesse a precipitação de proteínas, de DNA cromossômico, dos restos celulares e do SDS; a mistura foi mantida incubada durante 10 minutos em gelo. Passado este tempo, o conteúdo foi centrifugado por 5 minutos a 12.100 x g e o sobrenadante transferido para outro tubo, onde foram adicionados 100,0 µL de fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico (25:24:1) ocasionando a precipitação de resíduos proteicos. Centrifugou-se por 5 minutos a 12.100 x g e a fase aquosa pode ser retirada cuidadosamente, evitando a captação do material residual da interface. O sobrenadante foi depositado em novo tubo, onde também foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol, seguidos por 10 minutos de centrifugação a 12.100 x g, ocorrendo assim, a precipitação do DNA plasmidial. O DNA foi lavado com 100,0 µL de etanol 70%, centrifugado a 12.100 x g e colocado para secar. Quando seca, a amostra foi dissolvida em 30,0 µL de água ultrapura, e analisada em eletroforese de gel de agarose 1%.

#### 5.6.6.2. Purificação de plasmídeos em larga escala

Para a purificação de plasmídeos em larga escala (maxprep), foram cultivados 40,0 mL de cultura de *E. coli* DH10B com o plasmídeo de interesse em meio LB, durante aproximadamente 16 horas. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 x g, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em 5,0 mL de tampão GET

(Tris-HCl 25,0 mmol/L pH 8,0; glucose 50,0 mmol/L; EDTA 10,0 mmol/L). Em seguida, adicionou-se 5,0 mL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,2 mol/L) para a lise celular e homogeneizou-se delicadamente o conteúdo do frasco por inversão. Para que houvesse a precipitação de proteínas e demais restos celulares, foi acrescentado 5,0 mL acetato de potássio (3,0 mol/L, pH 4,8), mantendo-se a mistura incubada em gelo por 10 minutos. Após, centrifugou-se durante 10 minutos a 12.000 x g e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, tendo as proteínas residuais precipitadas pela adição de 1,0 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguido de 10 minutos de centrifugação a 12.000 x g. O sobrenadante foi coletado e o DNA plasmidial presente foi precipitado pela adição de 0,6 volumes de isopropanol, sendo lavado com 5,0 mL de etanol 70% na sequência. A amostra foi seca e ressuspensa em 100,0 µL de água ultrapura.

#### **5.6.7. EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO**

Para obter fragmentos de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão, foi utilizado o método descrito por Sambrook e colaboradores (1989) com algumas modificações. Inicialmente, foi realizada a eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,8%, utilizando o tampão TAE 1 X (Tris base 40,0 mmol/L; ácido acético 40,0 mmol/L; EDTA 2,0 mmol/L; pH 8,0); a eletroforese foi realizada a 50 V durante 2 horas. No gel foram depositados o marcador de peso molecular e a amostra. Para a amostra foi feito um poço grande com o auxílio de fita adesiva para conter o volume de 50,0 µL. Após a corrida, o gel foi cortado no sentido vertical em duas porções, a primeira deveria conter o poço do marcador e um pequeno pedaço do poço da amostra, e a segunda porção deveria conter apenas a restrição. A primeira porção foi corada com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 15 minutos e visualizado sob luz ultravioleta em comprimento de onda de 302 nm em transiluminador. No momento da visualização, uma régua apropriada foi colocada ao lado do gel para que se soubesse a altura em que a banda desejada estava localizada. Dessa forma, com o auxílio da régua foi possível identificar na segunda porção do gel, a posição da banda de DNA e assim recortá-la com o pedaço do gel que a continha. Esse fragmento de gel foi colocado em um tubo plástico de 1,5 mL para ser fundido a 65°C durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 volume de solução (igual ao volume do gel recortado) contendo 250,0 mmol/L de NaCl, 100,0 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 1,0 mmol/L de EDTA (concentrações finais). Na sequência, foi adicionado 1 volume de fenol equilibrado (pH 8,0) e a mistura homogeneizada cuidadosamente por inversão. O material foi centrifugado a 12.100 x g por 15 minutos, o sobrenadante (fase aquosa) transferido para um novo tubo e

precipitado com 1 volume de isopropanol, sendo centrifugado por 10 minutos a 12.100 x g. Após a precipitação, lavou-se o DNA com etanol 70%, seguido de centrifugação com retirada do sobrenadante e o precipitado foi seco e dissolvido em 10,0 µL de água ultrapura.

#### **5.6.8. PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES**

Preparar células eletrocompetentes modifica a permeabilidade da parede celular da bactéria e permite a entrada de DNA plasmidial através da membrana celular. Para o preparo de células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B e S17.1, o inóculo foi efetuado em 200,0 mL de meio LB, a 37°C e mantido sob agitação de 120,0 rpm até a cultura atingir D.O.<sub>600</sub> 0,6. A cultura foi mantida em gelo durante 30 minutos e, em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 12.000 x g, durante 5 minutos e a 4°C. O precipitado foi lavado e centrifugado duas vezes com 50,0 mL de água ultrapura estéril gelada, e uma vez com glicerol 15%. Após a última centrifugação a 12.000 x g, 4°C, por 5 minutos as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 15% e então distribuídas em volumes de 100,0 µL para tubos plásticos, os quais foram armazenadas a -70°C, ou então, imediatamente usados.

#### **5.6.9. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO**

Para transformação por eletroporação foram misturados 100,0 µL de células eletrocompetentes de *E.coli* S17.1 ou DH10B juntamente com 1,0 µL de ligação/plasmídeo. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação (Bio-Rad) e, em seguida, foi submetida a um campo elétrico (4KΩ, 330µF) para que o plasmídeo entrasse na célula. Após o choque, adicionou-se 1,0 mL de meio LB à cubeta, para a retirada das células. Em frasco apropriado, as células foram recuperadas a 37°C durante 1 hora. Com a recuperação finalizada, a cultura foi plaqueada em meio LA contendo os antibióticos seletivos.

#### **5.6.10. TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEO PARA ESTIRPES DE *H. seropedicae* POR CONJUGAÇÃO**

Primeiramente o plasmídeo de interesse foi transformado em *E.coli* S17.1, que foi a estirpe doadora do plasmídeo para o *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, o receptor. As células foram cultivadas durante 16 horas nos meios líquidos e temperaturas adequados, e

então foram re-inoculadas; *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 na proporção de 1/50 sendo cultivado por um período de 6 horas e *E.coli* S17.1 na proporção de 1/100 crescido por 3 horas. Em seguida, misturou-se 5 µL de *E.coli* S17.1, com 50 µL de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e a mistura foi depositada em forma de gota numa placa contendo meio LA e NFbHPN-Malato sólidos (1:1), sendo incubada a 30°C por 18 horas. A massa de células crescida foi coletada e dissolvida em 0,5 mL de meio NFb-Malato líquido, sendo plaqueado 250,0 µL da suspensão em uma placa contendo meio NFbLPN-Malato (baixo fosfato– 10,0 mL/L de fosfato; 20,0 mmol/L de cloreto de amônia) e antibióticos específicos para a obtenção dos transconjugantes. A placa foi incubada a 30°C durante 48 horas.

#### 5.6.11. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluorescência (SANGER *et al.*, 1977). O sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizado para confirmar a identidade das bactérias e o sequenciamento do fragmento de DNA clonado no vetor pTZ57R/T foi realizado para confirmação da construção. Para sequenciar os clones em pTZ57R/T usou-se os oligonucleotídeos iniciadores pilT E1 F e pilT E3R; os dois foram usados separadamente, um em cada reação. Para confirmação de identidade de *H. seropedicae* SmR1, usou-se o oligonucleotídeo iniciador 27F. Para a reação de sequenciamento usou-se o reativo BigDye Terminator v3.1 (Life Technologies). As reações de sequenciamento foram compostas por 3,0 µL de DNA amplificado, 2,0 µL de sequencing buffer 5x, 1,0 µL de sequencing mix RR-100, 0,5 µL de oligonucleotídeo iniciador apropriado, e 3,5 µL de água ultrapura. A reação foi incubada em um termociclador Eppendorf Master Cycler usando o seguinte programa de temperaturas: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto; 30 ciclos de 94°C por 20 segundos e 62°C por 1 minuto e 15 segundos.

A amostra resultante da reação de PCR de sequenciamento foi precipitada com adição de 10,0 µL de água ultrapura, 60,0 µL de isopropanol e 2,5 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L. Após 45 minutos de centrifugação a 14.000 x g, o DNA foi lavado com 150,0 µL de etanol 70% e centrifugado a 14.000 x g por mais 45 minutos. Ao final, o sobrenadante foi descartado e as amostras depois de completamente secas, foram ressuspensas e aplicadas no sequenciador automático. As sequências parciais obtidas para o gene 16S rDNA foram editadas usando o programa BioEdit (HALL, 1999) e usadas para busca de similaridade com o programa BLASTn (ZHANG *et al.*, 2000), utilizando o banco de dados "16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)" do NCBI.

## **5.7. ENSAIO DE FENÓTIPO DE POSSÍVEIS MUTANTES DO GENE *pilT* DELETADO**

### **5.7.1. ENSAIO DE *twitching motility***

Para o ensaio de *twitching motility*, as estirpes mutantes e selvagem foram crescidas em NFbHPN-Malato líquido até atingirem D.O.<sub>600</sub> 1,0. Em seguida, placas de Petri contendo uma fina camada de 3 mm de espessura de NFbHPN-Malato com 1,5% de ágar, foram perfuradas com palitos de dente imersos nas culturas crescidas. Com a finalidade de comparar o espalhamento da cultura no meio de cultivo, cada placa continha uma perfuração do selvagem, *H. seropedicae* SmR1, e uma do mutante. Depois de realizadas as perfurações as placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas; após esse período as placas foram fotografadas.

## **5.8. ENSAIOS *in planta***

### **5.8.1. PREPARAÇÃO DE SEMENTES DE *Vigna unguiculata***

Sementes da leguminosa *Vigna unguiculata* cultivar *Red Caloona*, foram esterilizadas ao serem imersas em ácido sulfúrico 97% durante 10 minutos. Em seguida, o ácido foi retirado cuidadosamente e neutralizado, e as sementes foram lavadas quatro vezes com água ultrapura estéril rapidamente, para impedir o aquecimento da água. As sementes foram então plantadas em placas de Petri contendo ágar-água 0,7% para germinação, incubadas a 30°C durante dois dias. Passado este tempo, as plântulas foram transferidas para vasos contendo vermiculita, esferas de polipropileno na superfície e solução nutritiva BD (BROUGHTON *et al.*, 1971). Esse sistema de vaso passou pelo processo de autoclavação para esterilização. Após aproximadamente 3 semanas de desenvolvimento no vaso a 30°C, com um período de luz de 16 horas, as plantas estavam prontas para a inoculação.

### 5.8.2. ENSAIOS DE INOCULAÇÃO POR INFILTRAÇÃO EM *Vigna unguiculata*

Para o ensaio de inoculação foram utilizadas as seguintes espécies de *Herbaspirillum*: *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1, *Herbaspirillum huttiense* subsp. *huttiense* 266, *Herbaspirillum autotrophicum* SA32, *Herbaspirillum huttiense* subsp. *putei* 7-2, *Herbaspirillum frisingense* GSF30, *Herbaspirillum chlorophenolicum* CPW301, *Herbaspirillum lusitanum* P6-12, *Herbaspirillum hiltneri* N3 e *Herbaspirillum rhizosphaerae* UMS37. Um mililitro da cultura de cada bactéria com D.O.<sub>600nm</sub> igual a 1,0 foi centrifugada a 12.100 x g, por 1 minuto e ressuspendida em 1,0 mL de solução de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 10,0 mmol/L. Esse volume de suspensão foi inoculado na face dorsal (abaxial) da folha com o auxílio de uma seringa sem agulha por infiltração. Uma pressão leve foi aplicada para que a cultura líquida fosse capaz de preencher os vasos da folha através de seus poros até onde fosse possível, próximo sempre do seu vaso principal e central. Usou-se como controle as plantas infiltradas somente com a solução de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 10,0 mmol/L, e, para cada um dos 11 tratamentos (10 espécies de *Herbaspirillum* e controle) foram despendidas 3 plantas. Por um período de 10 dias, as plantas permaneceram incubadas novamente a 30°C, com um fotoperíodo de 16 horas. A Figura 2 mostra a estratégia geral usada neste experimento.

### 5.8.3. RE-ISOLAMENTO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS A PARTIR DAS FOLHAS

A Figura 3 exemplifica como foi realizada esta etapa, onde após 10 dias da infiltração, as folhas inoculadas foram coletadas, tiveram as duas faces imersas em etanol 70% e em seguida em água ultrapura autoclavada. Uma área foliar circular de 1,57 cm<sup>2</sup> foi cortada e macerada em 1,0mL de salina 0,9%. Em seguida, foi feita a diluição seriada do macerado, em que 100,0 µL do mesmo foi diluído em 900,0 µL de salina 0,9%. Essa diluição é equivalente a 10<sup>-1</sup>; em seguida 100,0 µL desta última foram diluídos em mais 900,0 µL de salina 0,9%, sendo equivalente a 10<sup>-2</sup>, e assim diluiu-se o restante sucessivamente até 10<sup>-5</sup>. Ao final, cada diluição (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup>) foi plaqueada na forma de microgota com volume de 10,0 µL, em triplicata.



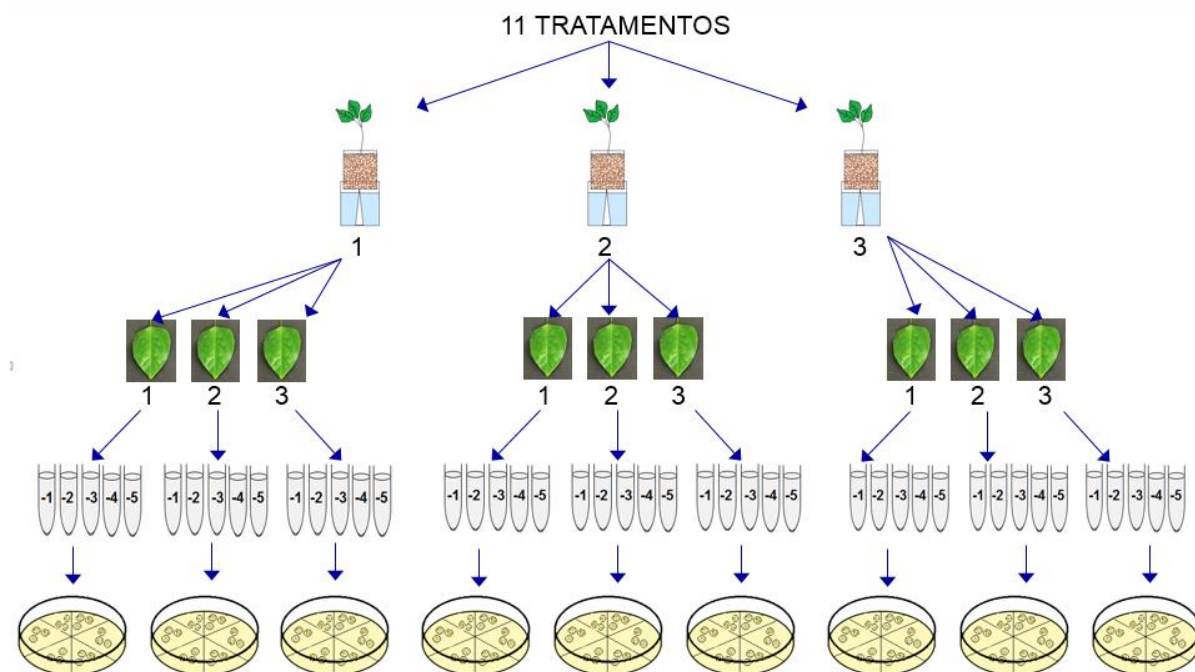


FIGURA 2 - ESQUEMA GERAL DA ESTRATÉGIA DE INFILTRAÇÃO EM *Vigna unguiculata*.  
FONTE: o autor.

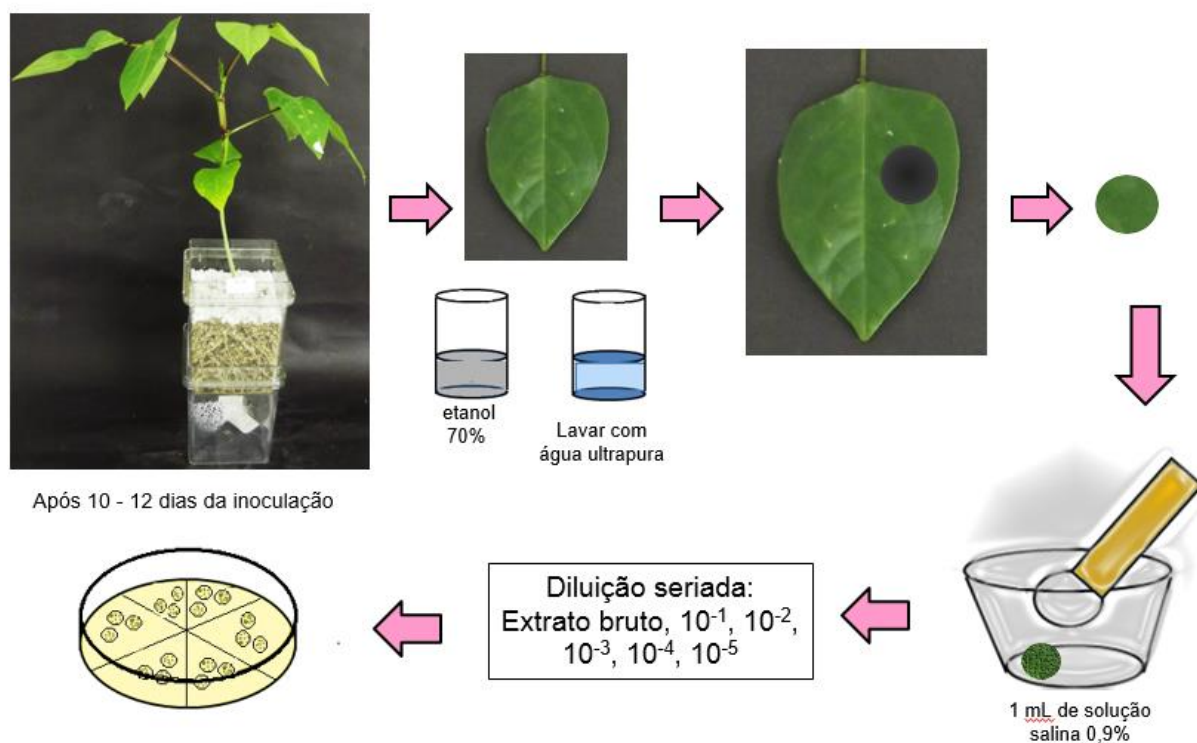


FIGURA 3- ESQUEMA DA RECUPERAÇÃO DAS CÉLULAS INFILTRADAS EM *Vigna unguiculata*.  
FONTE: o autor.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. ANÁLISE GENÔMICA DOS GENES ESTRUTURAIS DO SISTEMA *PILI* TIPO IV

Os genes estruturais do sistema *pili* tipo IV foram identificados na sequência genômica de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. Um total de 29 genes homólogos aos genes *pil* foram identificados e estão distribuídos em 8 regiões distintas do genoma (Tabela 8). Dentre estes genes, 5 codificam para proteínas hipotéticas (Hsero\_0806, Hsero\_0813, Hsero\_3649, Hsero\_4180 e Hsero\_4182), sem ortologia e motivos identificados (Tabela 8 e Tabela 9). Entretanto, estes genes encontram-se dentro das regiões genômicas identificadas para os genes *pil* e podem apresentar função relacionada (Apêndice 2). Em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 foram identificados 42 genes envolvidos na biogênese do *pili* tipo IV, incluindo genes regulatórios, e mais 18 genes equivalentes funcionais (BURROWS, 2012). Genes estruturais envolvidos em sistemas *pili* nestes dois organismos são listados na Tabela 10 em relação aos genes de referência do grupo de ortólogos do KEGG. A lista completa de genes estruturais, possivelmente envolvidos no sistema *pili* tipo IV em *H. seropedicae* SmR1, incluindo genes não identificados pelo KEGG é mostrada na Tabela 9. Dois genes homólogos ao gene *pilT* de *P. aeruginosa* PAO1 foram identificados no genoma de *H. seropedicae* SmR1, os genes Hsero\_0816 e Hsero\_3804 (Figura 4). Uma pesquisa de similaridade com o programa BLASTp contra o banco de dados de sequências de proteínas do Swiss-Prot indicou similaridade de 60% e 68%, respectivamente contra a *P. aeruginosa* PAO1. A ortologia KEGG indica homologia com grupo de ortólogos para sequências de PilT (Tabela 8) e análise de busca por motivos do banco de dados Pfam mostrou a presença do motivo P2SE para proteína dos sistemas de secreção do tipo II e IV (Tabela 9). Apesar da maior identidade e similaridade entre a proteína codificada pelo gene Hsero\_3804 com a proteína de *P. aeruginosa* PAO1, este gene encontra-se possivelmente formando um operon com o gene Hsero\_3805, que codifica para uma proteína glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9). Além disso, este possível operon está flanqueado por grupos de genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos. Por outro lado, o gene Hsero\_0816 encontra-se dentro de um grupo de genes envolvidos no sistema *pili* tipo IV (região genômica 3 na Tabela 8). Por este motivo, o gene Hsero\_0816 foi escolhido para a construção de um mutante.

TABELA 8 - GENES DE *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 ENVOLVIDOS NO SISTEMA *PILI* TIPO IV E ORTOLOGIA COM BANCO DE DADOS KEGG.

| Nome        | Localização <sup>1</sup> | Região genômica | Gene (nt) | Proteína (aa) | ORF ID                  | Definição  | Ortologia KEGG <sup>2</sup>   |
|-------------|--------------------------|-----------------|-----------|---------------|-------------------------|--|---|
| <i>pilD</i> | 390743..391606           | 1               | 864       | 287           | Hsero_0355              | Peptidase líder bifuncional / proteína transmembrana N-metiltransferase (EC 2.1.1.-) | K02654, peptidase líder (prepilina peptidase) / N-metiltransferase [EC 3.4.23.43 2.1.1.-] |
| <i>pilC</i> | 391658..392905           | 1               | 1.248     | 415           | Hsero_0356 (Hsero_0811) | Proteína do sistema de secreção do tipo II   | K02653, type IV pilus assembly protein PilC   |
| <i>pilB</i> | 392892..394025           | 1               | 1.134     | 377           | Hsero_0357 (Hsero_0810) | ATPase PilB  | K02652, type IV pilus assembly protein PilB   |
| <i>pilA</i> | 725663..726169           | 2               | 507       | 168           | Hsero_0660              | Proteína pilina do tipo IV   | K02650, type IV pilus assembly protein PilA   |
| Hsero_0806  | 883186..883878           | 3               | 693       | 230           | Hsero_0806              | Proteína hipotética  |   |
| <i>pilN</i> | 883878..885686           | 3               | 1.809     | 602           | Hsero_0807              | Formação pili tipo IVB, proteína de membrana externa                                 |   |
| <i>pilO</i> | 885696..886961           | 3               | 1.266     | 421           | Hsero_0808              | Proteína de montagem do pili Tfp tipo IV PilO  |   |
| <i>pilP</i> | 886951..887460           | 3               | 510       | 169           | Hsero_0809              | Proteína de montagem do pili Tfp tipo IV   |   |
| <i>gspE</i> | 887457..889082           | 3               | 1.626     | 541           | Hsero_0810              | Proteína E via de secreção geral   |   |
| <i>bfpE</i> | 889072..890145           | 3               | 1.074     | 357           | Hsero_0811              | Proteína BfpE, proteína de secreção geral  |   |
| <i>pilS</i> | 890220..890771           | 3               | 552       | 183           | Hsero_0812              | Proteína de montagem do pili tipo IV PilS  |   |
| Hsero_0813  | 890862..891359           | 3               | 498       | 165           | Hsero_0813              | Proteína hipotética  |   |
| <i>pilV</i> | 891356..892759           | 3               | 1.404     | 467           | Hsero_0814              | Proteína prepilina do tipo IV PilV   |   |
| Hsero_0815  | 892740..893237           | 3               | 498       | 165           | Hsero_0815              | Mureína lítica solúvel transglicosilase  |   |
| <i>pilT</i> | 893466..894563           | 3               | 1.098     | 365           | Hsero_0816              | <i>Twitching motility</i> proteína PilT  | K02669, twitching motility proteína PilT  |
| <i>pilZ</i> | 2325410..2326165         | 4               | 756       | 251           | Hsero_2062              | Proteína de montagem do pili tipo IV PilZ  |   |
| <i>pilV</i> | 4183489..4184001         | 5               | 513       | 170           | Hsero_3649              | Proteína hipotética  | K02671, Proteína de montagem do pili tipo IV PilV   |








Continua

## Continuação e conclusão





| Nome        | Localização <sup>1</sup> | Região genômica | Gene (nt) | Proteína (aa) | ORF ID                        | Definição   | Ortologia KEGG <sup>2</sup>  |
|-------------|--------------------------|-----------------|-----------|---------------|-------------------------------|---|--|
| <i>pilW</i> | 4184001..4184885         | 5               | 885       | 294           | Hsero_3650                    | Tfp proteína de montagem transmembrana PilW                         | K02672, proteína de montagem do pili tipo IV PilW  |
| Hsero_3651  | 4185029..4185487         | 5               | 459       | 152           | Hsero_3651                    | Proteína de montagem do pili tipo IV                                |  |
| <i>pilE</i> | 4185490..4185972         | 5               | 483       | 160           | Hsero_3652                    | Proteína transmembrana relacionada a pilina fimbrial do tipo 4      | K02655, proteína de montagem do pili tipo IV PilE  |
| <i>fimT</i> | 4185977..4186450         | 5               | 474       | 157           | Hsero_3653                    | Proteína transmembrana relacionada a pilina fimbrial do tipo 4      | K08084, proteína fimbrial biogênese do pili do tipo IV FimT  |
| <i>pilT</i> | 4356910..4357965         | 6               | 1.056     | 351           | Hsero_3804                    | Proteína de montagem do pili Tfp, retração do pili pela ATPase PilT | K02669, <i>twitching motility</i> proteína PilT  |
| <i>pilL</i> | 4396865..4399099         | 7               | 2.235     | 744           | Hsero_3839 (Hsero_2982 cópia) | CheA tipo histidina quinase (EC 2.7.3.-)                            | K0 2487, sensor histidina quinase e resposta regulatória do pili tipo IV; K06596, sistema quimiosensório proteína ChpA (sensor histidina quinase/resposta regulatória) |
| <i>pilJ</i> | 4399116..4401377         | 7               | 2.262     | 753           | Hsero_3840                    | Proteína transmembrana de <i>Twitching motility</i>                 | K02660, <i>twitching motility</i> proteína PilJ  |
| <i>pili</i> | 4401410..4401994         | 7               | 585       | 194           | Hsero_3841                    | Proteína de <i>Twitching motility</i>                               | K02659, <i>twitching motility</i> proteína PilL  |
| Hsero_4180  | 4781509..4782639         | 8               | 1.131     | 376           | Hsero_4180                    | Proteína hipotética   |  |
| <i>pilN</i> | 4782636..4783196         | 8               | 561       | 186           | Hsero_4181                    | Proteína de biogênese do pili tipo IV                               | K02663, proteína de montagem do pili tipo IV PilN  |
| Hsero_4182  | 4783761..4784369         | 8               | 609       | 202           | Hsero_4182                    | Proteína hipotética   |  |
| <i>pilQ</i> | 4784366..4786390         | 8               | 2.025     | 674           | Hsero_4183                    | Proteína de sinal para montagem da fimbria tipo IV                  | K02666, proteína de montagem do pili do tipo IV PilQ   |







<sup>1</sup>Localização no genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (número de acesso no GenBank CP002039); <sup>2</sup>Grupos de ortólogos de acordo com o KEGG Orthology.




TABELA 9 - ANÁLISE PFAM DAS SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO SISTEMA *PILI* TIPO IV.

| ORF ID                         | Família    | Descrição  | Envelope | Alinhamento | HMM            | Bit score | Valor E da pesquisa |   |
|--------------------------------|------------|--|----------|-------------|----------------|-----------|---------------------|---|
| Hsero_3841                     | CheW       | Domínio tipo CheW                                    | 48..188  | 50..186     | 3..136 (138)   | 55.0      | 5.3e-15             |    |
| Hsero_3840                     | MCPsignal  | Proteína de quimiotaxia Metil-receptor (MQP)         | 539..751 | 541..750    | 3..212 (213)   | 142.9     | 9.6e-42             |    |
| Hsero_3839 (Hsero_298 2 cópia) | Hpt        | Domínio Hpt  | 166..272 | 167..252    | 2..87 (90)     | 53.7      | 1.5e-14             |    |
|                                | HATPase_c  | Histidina quinase, DNA girase B, e HSP90 tipo ATPase | 457..595 | 460..594    | 5..110 (111)   | 64.1      | 8e-18               |   |
|                                | CheW       | Domínio tipo CheW                                    | 600..732 | 602..728    | 3..133 (138)   | 58.7      | 3.9e-16             |   |
| Hsero_0816 (Hsero_035 7)       | T2SE       | Proteína do sistema de secreção do tipo II/IV        | 13..281  | 23..274     | 12..265 (272)  | 138.9     | 1.4e-40             |    |
| Hsero_3804                     | T2SE       | Proteína do sistema de secreção do tipo II/IV        | 75..272  | 121..260    | 123..262 (272) | 120.2     | 7.2e-35             |   |
| Hsero_0660                     | N_methyl_2 | Sítio de metilação GFxxxE N-terminal do tipo IV      | 1..28    | 4..28       | 7..31 (31)     | 33.4      | 1.9e-08             |  |
|                                | Pilin      | Pilina (filamento bacteriano)                        | 41..167  | 41..167     | 1..108 (108)   | 67.3      | 1.7e-18             |   |
| Hsero_0357 (Hsero_081 0)       | T2SE       | Proteína do sistema de secreção do tipo II/IV        | 19..287  | 27..286     | 11..271 (272)  | 261.2     | 7.3e-78             |  |

Continua

| ORF ID                     | Família        | Descrição  | Envelope | Alinhamento | HMM          | Bit score | Valor E da pesquisa |   |
|----------------------------|----------------|--|----------|-------------|--------------|-----------|---------------------|---|
| Hsero_0356<br>(Hsero_0811) | T2SF           | Sistema de secreção do tipo II (T2SS), proteína F              | 81..204  | 81..204     | 1..124 (124) | 107.7     | 3.4e-31             |    |
|                            | T2SF           | Sistema de secreção do tipo II (T2SS), proteína F              | 285..407 | 285..407    | 1..124 (124) | 91.3      | 4e-26               |   |
| Hsero_0355                 | DiS_P_DiS      | Bacterial Peptidase A24 domínio N-terminal                     | 21..128  | 21..127     | 1..91 (92)   | 119.3     | 4.5e-35             |    |
|                            | Peptidas e_A24 | Família dapeptidase líder do tipo IV                           | 136..245 | 137..245    | 2..106 (106) | 98.2      | 2.7e-28             |   |
| Hsero_4183                 | AMIN           | Domínio AMIN   | 26..121  | 38..120     | 11..94 (95)  | 25.5      | 8.9e-06             |    |
|                            | STN            | Domínio curto de secreção e TonB N-terminal                    | 273..321 | 273..320    | 1..51 (52)   | 30.1      | 2.5e-07             |   |
|                            | Secretin N     | Domínio curto do sistema de secreção do tipo II/III bacteriano | 346..420 | 348..420    | 3..82 (82)   | 32.9      | 5.4e-08             |   |
|                            | Secretin       | Proteína do Sistema de secreção do tipo II e III bacteriana    | 514..669 | 514..668    | 1..164 (165) | 160.4     | 2.4e-47             |   |
| Hsero_4181                 |                |  |          |             |              |           |                     | NENHUM MOTIVO ENCONTRADO  |
| Hsero_3649                 |                |  |          |             |              |           |                     | NENHUM MOTIVO ENCONTRADO  |
| Hsero_3650                 | N methyl 2     | Sítio de metilação GFxxx E N-terminal do tipo IV               | 1..28    | 2..28       | 5..31 (31)   | 34.0      | 1.2e-08             |  |

| ORF ID     | Família      | Descrição   | Envelope | Alinhamento | HMM           | Bit score | Valor E da pesquisa |   |
|------------|--------------|---|----------|-------------|---------------|-----------|---------------------|---|
| Hsero_3652 |              |   |          |             |               |           |                     | NENHUM MOTIVO ENCONTRADO  |
| Hsero_4182 | PilP         | Proteína de montagem do pili, PilP                          | 53..171  | 59..168     | 13..129 (149) | 23.0      | 5.8e-05             |    |
| Hsero_3804 |              |   |          |             |               |           |                     |   |
| Hsero_2062 |              |   |          |             |               |           |                     | NENHUM MOTIVO ENCONTRADO  |
| Hsero_4180 |              |   |          |             |               |           |                     | NENHUM MOTIVO ENCONTRADO  |
| Hsero_0810 | T2SE         | Proteína do sistema de secreção do tipo II/IV               | 120..406 | 129..405    | 8..271 (272)  | 158.3     | 1.7e-46             |    |
| Hsero_0809 |              |   |          |             |               |           |                     | NENHUM MOTIVO ENCONTRADO  |
| Hsero_0808 |              |   |          |             |               |           |                     | NENHUM MOTIVO ENCONTRADO  |
| Hsero_0807 | Secretin     | Proteína do Sistema de secreção do tipo II e III bacteriana | 424..599 | 424..596    | 1..162 (165)  | 61.5      | 5.8e-17             |    |
|            | Secretin_N_2 | Domínio N-terminal da secretina                             | 233..325 | 234..324    | 2..97 (98)    | 44.7      | 1.3e-11             |   |
| Hsero_0806 | TcpQ         | Toxina co-regulatória da proteína da biosíntese do pili     | 146..230 | 147..228    | 2..82 (85)    | 87.9      | 2.9e-25             |    |
| Hsero_0812 | PilS         | pilS N- terminal  | 55..183  | 57..182     | 3..132 (133)  | 93.1      | 9.5e-27             |  |
| Hsero_0811 | T2SF         | Sistema de secreção do tipo II (T2SS), proteína F           | 22..148  | 22..148     | 1..124 (124)  | 61.5      | 6,9e-17             |  |
|            | T2SF         | Sistema de secreção do tipo II (T2SS), proteína F           | 223..345 | 223..344    | 1..122 (124)  | 46.4      | 3.2e-12             |   |

| ORF ID     | Família    | Descrição   | Envelope | Alinhamento | HMM          | Bit score | Valor E da pesquisa |   |
|------------|------------|---|----------|-------------|--------------|-----------|---------------------|---|
| Hsero_0814 | Shufflon_N | Proteína bacteriana shufflon, região N-terminal constante | 12..390  | 15..372     | 5..328 (356) | 69.8      | 2e-19               |  |
| Hsero_0813 |            |   |          |             |              |           |                     | NENHUM MOTIVO ENCONTRADO  |
| Hsero_0815 | SLT        | Transglicosilase domínio SLT                              | 42..160  | 43..151     | 2..112 (121) | 98.7      | 1.5e-28             |  |
| Hsero_3653 | N_methyl_2 | Sítio de metilação GFxxxE N-terminal do tipo IV           | 1..21    | 3..21       | 13..31 (31)  | 27.5      | 1.4e-06             |  |
|            | GspH       | Proteína de transporte do tipo II GspH                    | 41..138  | 41..135     | 1..111 (114) | 33.5      | 3.5e-08             |   |
| Hsero_3651 |            |   |          |             |              |           |                     | NENHUM MOTIVO ENCONTRADO  |



```

PILT_PSEAEFSFEVPGVARFRVNAFNQNRGAGAVFRITIPSKVLTMEELGMGEVFKRVSDVPRGLVLVTGPTGSGKSTTLAAML DYLNNT 150
Hsero_0816YVLGEWRLR-CNIYRMARGSKVAVSIRRFPLEPLALERTGLPSYVKTVLEATKGIILVTGPTGAGKTTTTLASMLDYINAS 159
Hsero_3804FAIELAALGRFRVHAFRLRQGGPAVAIRHLGREPPPTLAQLGAPPLCAELAERAGGLVLVTGPTGAGKSSTLAAMIRHLNET 150

PILT_PSEAEKYHHILTIEDPIEFVHESKKCLVNQREVHRDTLGFSEALRSALREDPDIILVGEMRDLETIRLALTAETGHLVFGTLHT 230
Hsero_0816RRGHITITIEEPIEYELQRKQSMISQKEVPTDIESFSSGLREALRQKPDVLMVGEIRDFTADTVLHAGESGHLVLATLHT 239
Hsero_3804RALHILTIEDPIEFITHTPQRALISQRELGTHTADLPALRAALRADPDVLLVGELRDADTIRLALTAETGHLVLGTLHA 230

PILT_PSEAE TSAKTIDRVVDVFPAAEEKAMVRSMLSESLSQSVISQTLIKKIGG-GRVAAHEIMIGTP-AIRNLIRE-DKVAQMYS AIQT 307
Hsero_0816SSAVRAITKLLGFFPQEQRAQRAATLAESLVGVIFQSLLPSEEDGEHHVMASEMVFNNNQIAAFISDPAKLHLIGDFMKR 319
Hsero_3804ASAARTVERMLDVFPAGEKEPARAMLAESLQGVIAQTLLPTADGRARVAHELLVATP-AVRNLIRE-GRSAQLLSIMQA 308

PILT_PSEAE GGSLLGMQTLDMCKGLVAKGLISRENAREKAKIPENF----- 344
Hsero_0816KEDNMSRSLNEVILLQLVHKKSVSARDALRVAYNRLELHEMLNSAKR 365
Hsero_3804GAAQGMQTLAAALQRLHQQGRISAQTLRQH LGQEPQAGPGMAV--- 351

```

## Resultado da pesquisa BLASTp

## Matriz de identidade

Pseudomonas aeruginosa PAO1  
sp | P24559.1 | PILT\_PSEAE ength 344aa

PILT\_PSEAE Hsero\_0816 Hsero\_3804

Hsero\_0816

score: 190bits(482)  
E value: 4e-55  
identity: 105/273(38%)  
positives: 165/273(60%)  
gaps: 6/273(2%)

|            | PILT_PSEAE | Hsero_0816 | Hsero_3804 |
|------------|------------|------------|------------|
| PILT_PSEAE | 1,000      |            |            |
| Hsero_0816 | 0,297      | 1,000      |            |
| Hsero_3804 | 0,481      | 0,306      | 1,000      |

Hsero\_3804

score: 336bits(862)  
E value: 6e-112  
identity: 169/337(50%)  
positives: 232/337(68%)  
gaps: 1/337(0%)

FIGURA 4. ANÁLISE DE SIMILARIDADE ENTRE AS PROTEÍNAS PILT DE *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 (Hsero\_0816 E Hsero\_3804) E *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PILT\_PSEAE). **Acima**, alinhamento múltiplo das proteínas obtido com o programa ClustalW, executado a partir do programa BioEdit (HALL, 1999), usando a configuração padrão; os resíduos de aminoácidos conservados nas três sequências são mostrados em caixas pretas; **abaixo e à esquerda**, resultado para uma busca de similaridade com o programa BLASTp (ALTSCHUL *et al.*, 1997), usando as configurações padrão, contra o banco de dados Swiss-Prot; as estatísticas para os alinhamentos contra os primeiros *hits* são mostrados para as sequências de proteínas codificadas para os genes Hsero\_0816 e Hsero\_3804 de *H. seropedicae* SmR1; **abaixo e à direita**, matriz de identidade para o alinhamento entre as sequências de proteínas obtido com auxílio do programa BioEdit.

TABELA 10. GENES ENVOLVIDOS NO *PILI* TIPO IV EM *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 E GRUPOS DE ORTÓLOGOS DO KEGG.

| Categoria   | Subcategoria                             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1                              | <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1  | Referência hierarquica/Ortologia KEGG (KO)  |
|---|--|---|---|---|
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de <i>twitching motility</i>   | PA0408 pilG; <i>twitching motility</i> proteína PilG            |   | K02657 pilG; twitching motility two-component system response regulator PilG                    |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de <i>twitching motility</i>   | PA0409 pilH; <i>twitching motility</i> proteína PilH            |   | K02658 pilH; twitching motility two-component system response regulator PilH                    |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de <i>twitching motility</i>   | PA0410 pill; <i>twitching motility</i> proteína Pill            | Hsero_3841 pill; proteína de <i>twitching motility</i>  | K02659 pill; twitching motility protein Pill  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de <i>twitching motility</i>   | PA0411 pilJ; <i>twitching motility</i> proteína PilJ            | Hsero_3840 pilJ; proteína transmembrana de <i>twitching motility</i>                                      | K02660 pilJ; twitching motility protein PilJ  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de <i>twitching motility</i>   | PA0412 pilK; metiltransferase PilK                              |   | K02661 pilK; type IV pilus assembly protein PilK  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de <i>twitching motility</i>   | PA0413 chpA; proteína transdutora de sinal sistema quimiotático | Hsero_3839 CheA-like histidina quinase  | K02487 pilL; type IV pili sensor histidine kinase and response regulator                        |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de <i>twitching motility</i>   | PA4547 pilR; regulador de resposta de dois componentes<br>PilR  |   | K02667 pilR; two-component system, NtrC family, response regulator PilR                         |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de <i>twitching motility</i>   | PA4546 pilS; sensor de dois componentes<br>PilS                 |   | K02668 pilS; two-component system, NtrC family, sensor histidine kinase PilS [EC:2.7.13.3]      |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de <i>twitching motility</i>   | PA0395 pilT; proteína de <i>twitching motility</i><br>PilT      | Hsero_0816 pilT; <i>twitching motility</i> proteína PilT   Hsero_3804 Tfp<br>proteína de montagem do pili | K02669 pilT; twitching motility protein PilT  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de <i>twitching motility</i>   | PA0396 pilU; proteína de <i>twitching motility</i><br>PilU      |   | K02670 pilU; twitching motility protein PilU  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas do sistema pili quimiosensório |   |   | K06596 chpA; chemosensory pili system protein ChpA (sensor histidine kinase/response regulator) |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas do sistema pili quimiosensório | PA0414 chpB; metilesterase                                      |   | K06597 chpB; chemosensory pili system protein ChpB (putative protein-glutamate methylesterase)  |

Continua

| Categoria   | Subcategoria                             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1   | <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1   | Referência hierarquica/Ortologia KEGG (KO)  |
|---|--|--|--|---|
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas do sistema pili quimiosensório | PA0415 chpC; proteína quimiotática   |  | K06598 chpC; proteína do sistema pili quimiosensório ChpC   |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas do sistema pili quimiosensório | PA0416 chpD; regulador transcricional  |  | K06599 chpD; AraC família transcricional reguladora, proteína do sistema pili quimiosensório ChpD |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas do sistema pili quimiosensório | PA0417 chpE; proteína quimiotática   |  | K06600 chpE; proteína do sistema pili quimiosensório ChpE   |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili            | PA4525 pilA; fimbria tipo 4 PilA   | Hsero_0660 pilA; proteína pilina A do tipo IV  | K02650 pilA; proteína de montagem do pili tipo IV PilA  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili            | PA4526 pilB; biogênese fimbrial do tipo 4 PilB                                 | Hsero_0357 pilB; ATPase PilB   | K02652 pilB; proteína de montagem do pili tipo IV PilB  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili            |  | Hsero_0356 pilC; proteína do Sistema de secreção do tipo II                            | K02653 pilC; proteína de montagem do pili tipo IV PilC  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili            | PA4528 pilD; prepilina peptidase do tipo 4 PilD                                | Hsero_0355 pilD; peptidase líder bifuncional/N-metiltransferase proteína transmembrana | K02654 pilD; peptidase líder (prepilina peptidase) / N-metiltransferase [EC:3.4.23.43 2.1.1.-]    |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili            | PA3805 pilF; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilF                     |  | K02656 pilF; proteína de montagem do pili tipo IV PilF  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili            | PA5040 pilQ; biogênese da proteína fimbrial da membrana externa do tipo 4 PilQ | Hsero_4183 pilQ; proteína fimbrial e peptídeo de sinal do tipo 4                       | K02666 pilQ; proteína de montagem do pili tipo IV PilQ  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili            | PA5041 pilP; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilP                     |  | K02665 pilP; proteína de montagem do pili tipo IV PilP  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili            | PA5042 pilO; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilO                     |  | K02664 pilO; proteína de montagem do pili tipo IV PilO  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili            | PA5043 pilN; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilN                     | Hsero_4181 proteína de biogênese do pili tipo IV                                       | K02663 pilN; proteína de montagem do pili tipo IV PilN  |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili            | PA5044 pilM; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilM                     |  | K02662 pilM; proteína de montagem do pili tipo IV PilM  |

## Continuação

| Categoria   | Subcategoria                  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1                           | <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1                                 | Referência hierarquica/Ortologia KEGG (KO)                     |
|---|-------------------------------|--|--|--|
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA2960 pilZ; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilZ   |  | K02676 pilZ; proteína de montagem do pili tipo IV PilZ         |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4551 pilV; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilV   | Hsero_3649, proteína hipotética  | K02671 pilV; proteína de montagem do pili tipo IV protein PilV |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4552 pilW; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilW   | Hsero_3650 pilW; Tfp proteína transmembrana de montagem do pili pilW   | K02672 pilW; proteína de montagem do pili tipo IV PilW         |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4553 pilX; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilX   |  | K02673 pilX; proteína de montagem do pili tipo IV PilX         |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4554 pilY1; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilY1 |  | K02674 pilY1; proteína de montagem do pili tipo IV PilY1       |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4555 pilY2; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilY2 |  | K02675 pilY2; proteína de montagem do pili tipo IV PilY2       |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4556 pilE; biogênese da proteína fimbrial do tipo 4 PilE   | Hsero_3652, proteína transmembrana pilina-relacionada a fimbria tipo 4 | K02655 pilE; proteína de montagem do pili tipo IV PilE         |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4306 flp; pilina Flp do tipo IVb                           |  | K02651 flp; proteína de montagem do pili Flp/PilA              |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4295 fppA; Flp prepilina peptidase A, FppA                 |  | K02278 cpaA; prepilina peptidase CpaA [EC:3.4.23.43]           |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4305 rcpC; proteína RcpC                                   |  | K02279 cpaB; proteína de montagem do pili CpaB                 |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4304 rcpA; proteína RcpA                                   |  | K02280 cpaC; proteína de montagem do pili CpaC                 |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili |  |  | K02281 cpaD; proteína de montagem do pili CpaD                 |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4303 tadZ; proteína TadZ                                   |  | K02282 cpaE; proteína de montagem do pili CpaE                 |

| Categoria   | Subcategoria                  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1   | <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1                              | Referência hierarquica/Ortologia KEGG (KO)            |
|---|-------------------------------|--|---|---|
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas de montagem do pili | PA4302 tadA; ATPase TadA   |   | K02283 cpaF; proteína de montagem do pili CpaF        |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           | PA2128 cupA1; subunidade fimbrial CupA1  |   | K07345 fimA; subunidades principal fimbrial do tipo 1 |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           | PA4651 chaperona de montagem do pili   PA4085 cupB2; chaperona CupB2   PA2129 cupA2; chaperona CupA2 | Hsero_2574 papD; PilP proteína chaperona transmembrana de montagem  | K07346 fimC; proteína chaperona fimbrial              |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           | PA4652 proteína hipotética   PA2130 cupA3; CupA3   PA0994 cupC3; CupC3   PA4084 cupB3; CupB3         | Hsero_2575 papC; proteína de montagem do pili, proteína porina PapC | K07347 fimD; proteína de membrana externa             |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           |  |   | K07348 fimF; subunidade fimbrial menor                |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           |  |   | K07349 fimG; subunidade fimbrial menor                |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           |  |   | K07350 fimH; subunidade fimbrial menor                |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           |  |   | K07351 fimI; proteína fimbrial                        |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           |  |   | K07352 sfmA; proteína fimbrial do tipo 1              |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           |  |   | K07353 sfmC; proteína chaperona fimbrial              |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           |  |   | K07354 sfmD; proteína de membrana externa             |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           |  |   | K07355 sfmF; proteína tipo fimbrial                   |
| Proteínas de motilidade bacteriana – Sistema pili | Proteínas fimbriais           |  |   | K07356 sfmH; proteína fimbrial                        |

## 6.2. COMPARAÇÃO DE MOTIVOS CONSERVADOS DA PROTEÍNA PILT EM *Herbaspirillum seropedicae*

Homólogos da proteína PilT compartilham a presença de quatro domínios conservados em todos os membros da superfamília de ATPases de secreção, incluindo dois motivos de ligação ao nucleotídeo denominados Walker boxes A e B e duas regiões conservadas designadas como Asp e His boxes. Além disso, é comum possuírem motivos de sequência única na região C-terminal (AUKEMA, *et al.*, 2005; PLANET *et al.*, 2001).

Walker box A possui o P-loop GX4GK (S/T); Walker box B tem a sequência DhhhhDE (onde h significa hidrofóbico) podendo o aspartato (D) conservado ser trocado por uma glicina ou uma alanina. Além disso, o Asp box entre ambos os motivos Walker poderia funcionar como um local de ligação ao  $Mg^{2+}$ . O quarto motivo conservado, Asp box, inclui dois resíduos de histidina (PLANET *et al.*, 2001). Os motivos únicos na região C-terminal possuem as sequências AIRNLIRE e GMQTXXXXLXXLXXXXXI (AUKEMA, *et al.*, 2005).

Foram comparadas as sequências de aminoácidos da proteína PilT em organismos de diferentes espécies, onde esta proteína é bem descrita, com a sequência em *H. seropedicae* SmR1, para verificar a presença dos domínios conservados. Nesta análise comparou-se *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *C. perfringens*, *C. difficile* e *E. coli*, com o *Herbaspirillum seropedicae*. Na Figura 5, é possível notar que os quatro motivos, Walker boxes A e B e boxes Asp e His, são bem conservados em todas as espécies analisadas e que o C-terminal AIRNLIRE e GMQTXXXXLXXLXXXXXI presente em *P. aeruginosa* só não é bem conservado em *E. coli* e *H. seropedicae*.

Uma análise realizada usando o programa MView mostrou que a proteína PilT codificada pelo gene Hsero\_0816 de *H. seropedicae* possui 31,5% de identidade com a proteína PilT de *P. aeruginosa*, enquanto que as PilT de *C. perfringens* e *C. difficile* mostraram aproximadamente 50% de similaridade com a de *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* e *R. solanacearum* apresentaram similaridade de aproximadamente 70% e *E. coli* apresentou similaridade de 26,8%. Essas comparações e porcentagens também já foram verificadas por Melville & Craig (2013), que sugerem que porcentagens acima de 50% de conservação da sequência desta proteína é benéfica para a sobrevivência da bactéria.

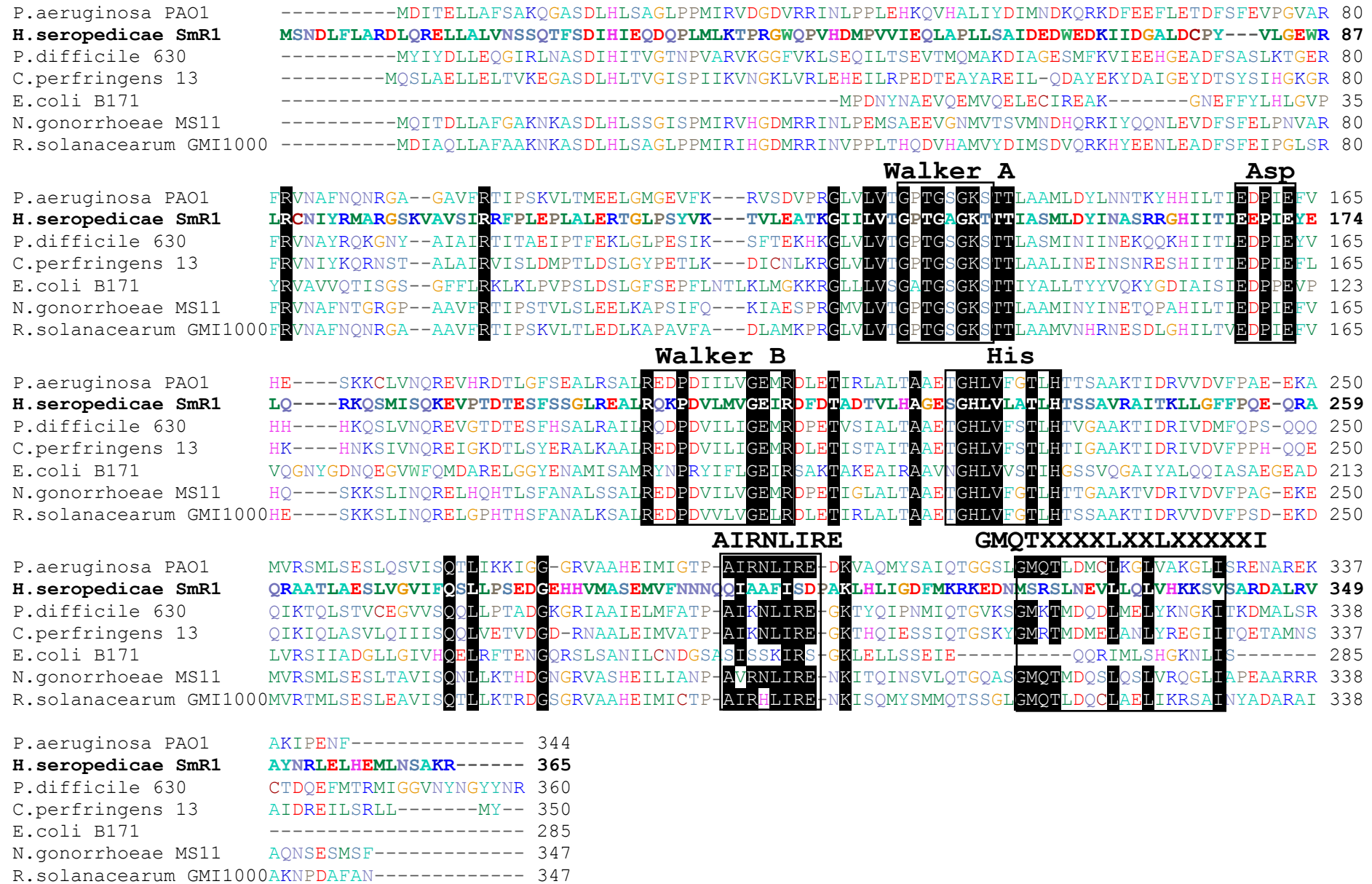


FIGURA 5. ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS REGIÕES CONSERVADAS NA PROTEÍNA PILT. Resíduos idênticos são mostrados em fundo preto, e os domínios conservados estão dentro das caixas. *P. aeruginosa* PilT (nº de acesso ao GenBank NP\_249086), *H. seropedicae* PilT (ADJ62335.1) *C. perfringens* PilT (NP\_562683), *C. difficile* PilT (YP\_001090026), *N. gonorrhoeae* PilT (ZP\_06134424) e *E. coli* BfpF (ZP\_03062138).

### 6.3. CONSTRUÇÃO DO MUTANTE *pilT* de *H. seropedicae* SmR1

A estratégia de mutagênese utilizada está esquematizada na Figura 6. A fim de caracterizar o fenótipo da deleção do gene *pilT* de *H. seropedicae* SmR1, um fragmento localizado na parte central do gene foi deletado ao final da etapa de clonagem. As regiões a montante e a jusante do fragmento permitiram, na etapa seguinte, deletar o fragmento central do genoma de *H. seropedicae* SmR1 por recombinação homóloga. Para colocar em prática a estratégia mutagênica de deleção parcial do gene *pilT* dois fragmentos parciais do gene foram gerados por amplificação por PCR a partir dos oligonucleotídeos iniciadores indicados na TABELA 11: o "fragmento A" foi gerado a partir do primeiro terço do gene (incluindo também uma pequena porção a montante), com 367 pb; o "fragmento B" foi gerado a partir do terço final do gene (incluindo também uma pequena porção a jusante), com 293 pb. Cada fragmento amplificado foi clonado separadamente em vetor pTZ57R/T, conforme recomendações do fabricante (FERMENTAS) (Figura 7). Em seguida, o "fragmento A" foi extraído do vetor por digestão com as endonucleases de restrição *HindIII* e *BglII* e purificado em gel de agarose de baixo ponto de fusão (Figura 8 A e B). O "fragmento A" purificado (Figura 8 B) foi ligado ao "fragmento B" clonado no pTZ57R/T, sendo a construção resultante denominada pTZpilTAB (Figura 8C). O produto da ligação foi então transformado em *E.coli* DH10B.

Para confirmação desta clonagem, foram feitas minipreparações de plasmídeos de algumas colônias, e o DNA foi digerido com 3 conjuntos de endonucleases de restrição; primeiro foi realizada a digestão com *BglII*, originando uma banda de 3.546 pb, correspondente ao pT57ZR/T (2.886 pb) mais o fragmento pilTAB (660 pb); em segundo, foi realizada a digestão com *HindIII* e *BglII*, resultando em uma banda de 367 pb, referente ao fragmento A e outra de 3.179 pb, referente ao pTZ57R/T (2.886 pb) mais o fragmento B (293); e em terceiro, foi realizada a digestão com *HindIII* e *BamHI*, formando uma banda de 660 pb, correspondente ao fragmento A mais o fragmento B, e uma banda de 2.886 pb, correspondente ao vetor (Figura 9). Os perfis de restrição que melhor estavam representados foram escolhidos para serem sequenciados. Neste caso, foram escolhidos três clones (números 1, 2 e 4 da Figura 9) que foram amplificados (Figura 10) e sequenciados. O sequenciamento mostrou que a montagem da deleção estava correta (dado não mostrado). Em seguida o fragmento pilTAB (agora com 660 pb) foi cortado do vetor pTZ57R/T, usando as endonucleases de restrição *HindIII* e *BamHI*, sendo extraído e purificado do gel de baixo ponto de fusão (Figura 11). Feito isso, o fragmento foi clonado no vetor pSUP202, que também foi previamente digerido com *HindIII* e *BamHI*, a fim de permitir a ligação do fragmento. A ligação foi realizada e transformada por eletroporação em *E. coli* DH10B, e as colônias resultantes desse processo, tiveram seus plasmídeos purificados e



cortados com o par de enzimas *Hind*III e *Bam*HI para confirmação da inserção (Figura 12). Essa construção foi denominada pSUPpilTAB.

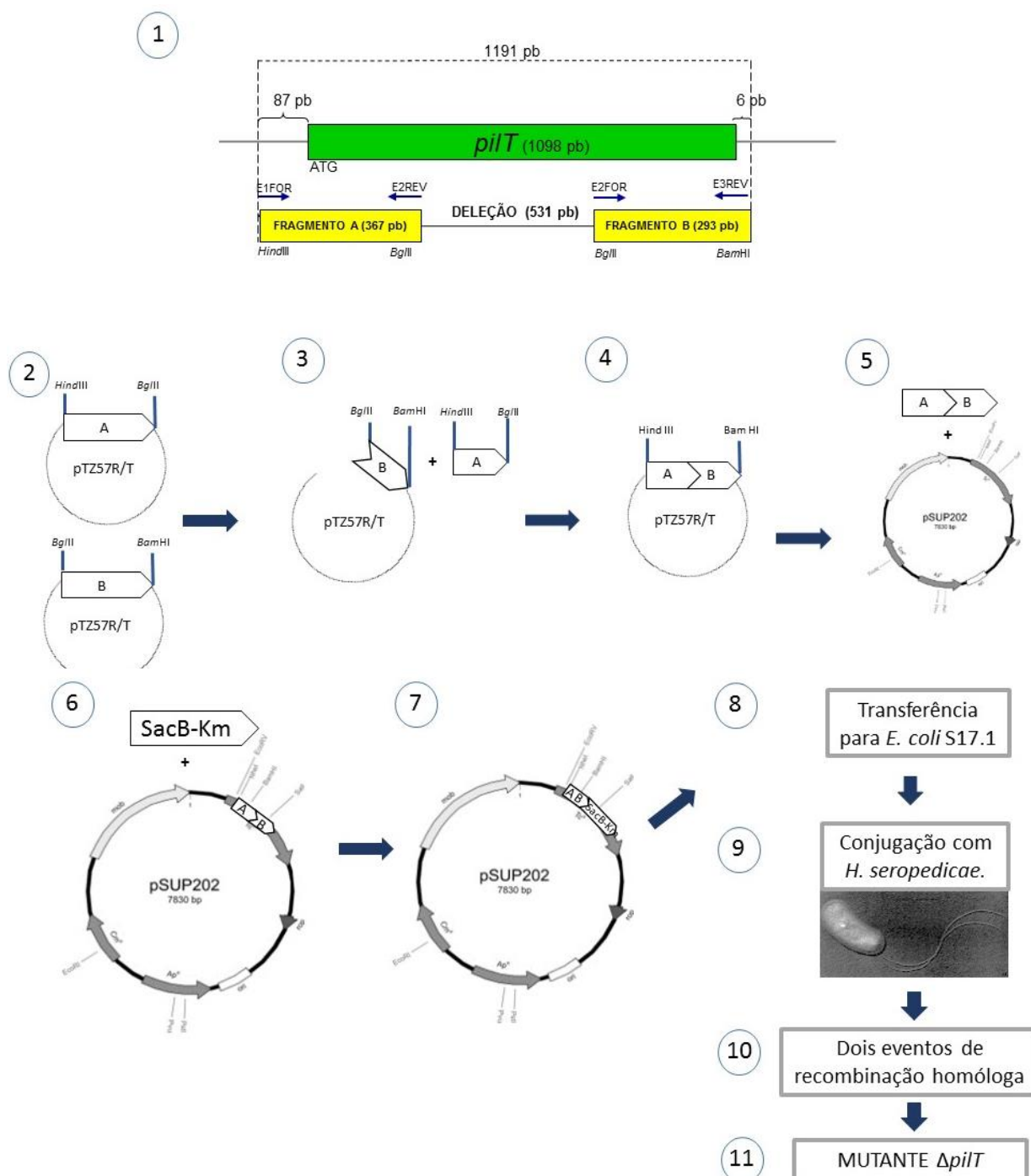


FIGURA 6. ESTRATÉGIA UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DE MUTANTES COM *pilT* DELETADO DE *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 (DETALHES DA CONSTRUÇÃO SÃO MOSTRADOS NO APÊNDICE 1).

TABELA 11. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES USADOS PARA CLONAGEM DO GENE *pilT* DE *Herbaspirillum seropedicae* SmR1.

| OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR | SEQUÊNCIA (5'→3') <sup>1</sup>        | TM (°C) | ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO USADA PARA CLONAGEM |
|----------------------------|---------------------------------------|---------|--|
| <i>pilT</i> E1 F           | GCCA <u>AAGCTT</u> GTATAGTAGACTCATTCG | 62,0    | <i>Hind</i> III                                |
| <i>pilTE2</i> R            | GATAGATCCTTGCAGCGTAGCCG               | 62,0    | <i>Bgl</i> II                                  |
| <i>pilT</i> E2 F           | GCAAGATCCTTCCAGAGCCTGTT               | 62,0    | <i>Bgl</i> II                                  |
| <i>pilT</i> E3 R           | ACGGGATCCGCGTTGGC                     | 62,0    | <i>Bam</i> HI                                  |

<sup>1</sup>Os sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas listadas na coluna "Enzima de restrição usada para clonagem" estão sublinhados nas sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.

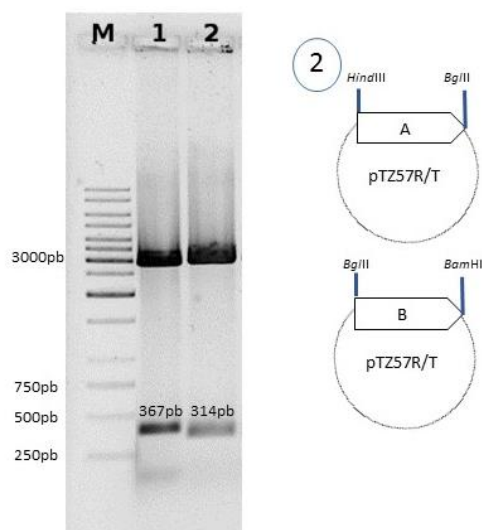


FIGURA 7. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EVIDENCIANDO O PERFIL DE RESTRIÇÃO DO pTZ*pilTA* (LINHA 1) E DO pTZ*pilTB* (LINHA 2). Linha 1: fragmento maior possui 2886 pb (pTZ57R/T), e o fragmento menor 367 pb (fragmento A). Linha 2: fragmento maior possui 2886 pb (pTZ57R/T), fragmento menor possui 293 pb (fragmento B). Ao lado da imagem são mostrados esquemas com os fragmentos de vetor e DNA correspondentes; M, marcador molecular 1kb DNA ladder.

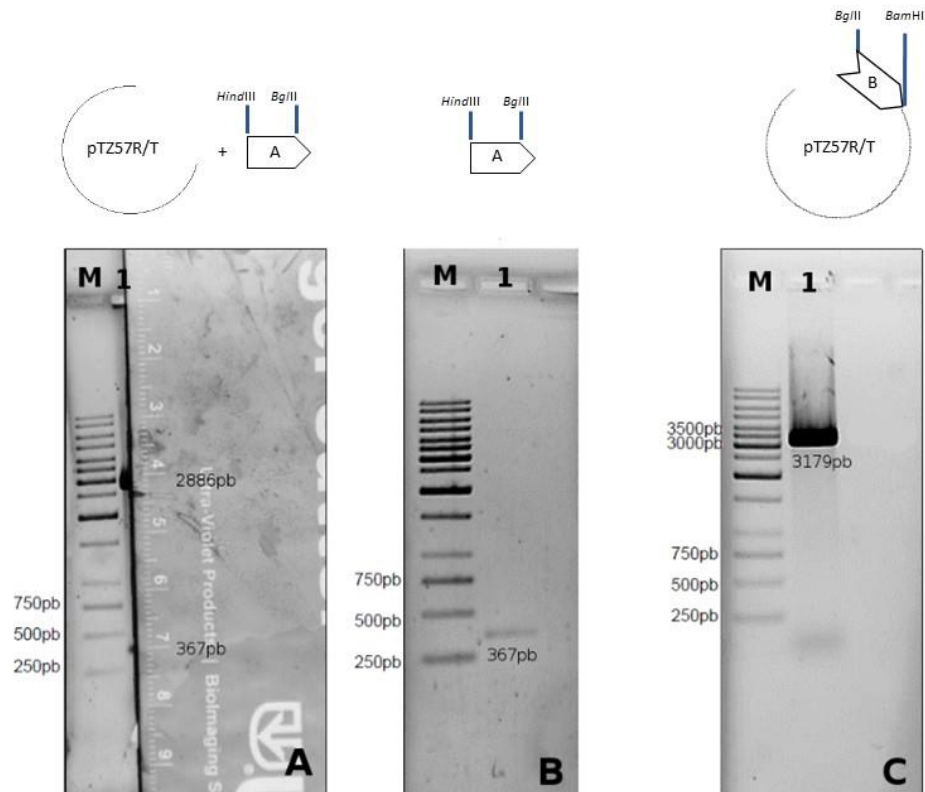


FIGURA 8. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE MOSTRANDO A EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO A CLONADO NO VETOR pTZpiITA PARA LIGAÇÃO NO FRAGMENTO B CLONADO NO VETOR pTZpiITB. **(A)** Gel de agarose de baixo ponto de fusão; no poço 1, a banda de 2.886 pb, corresponde ao vetor, e a banda de 367 pb, corresponde ao fragmento AB; são mostrados à esquerda as indicações correspondentes ao peso molecular; **(B)** gel de agarose mostrando o fragmento A (poço 1, banda de 367 pb) após o processo de extração e purificação; **(C)** gel de agarose mostrando o vetor pTZpiITB, contendo o fragmento B clonado, aberto (poço 1, banda de 3179 pb); acima das imagens são mostrados esquemas com os fragmentos de vetor e DNA correspondentes; M, marcador molecular *1kb DNA ladder*.

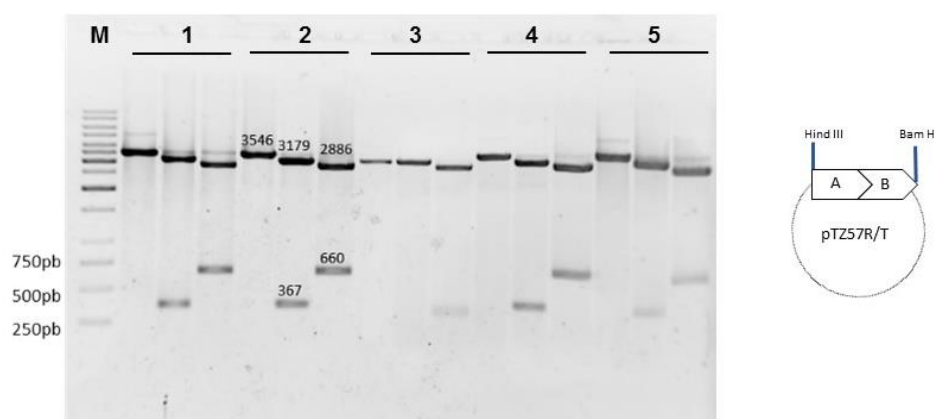


FIGURA 9. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EVIDENCIANDO A DIGESTÃO DE COLÔNIAS OBTIDAS DA CLONAGEM DE pTZpilTAB PARA CONFIRMAÇÃO. Cada colônia (1,2,3 e 4) foi digerida com 3 conjuntos de enzimas; primeira linha com *Bgl*II, originando uma banda de 3546 pb correspondente ao pTZ57R/T (2886 pb) mais o fragmento pilTAB (660 pb); segunda linha, com *Hind*III e *Bgl*II, resultando em uma banda de 367 pb referente ao fragmento A e outra de 3179 pb referente ao pTZ57R/T mais o fragmento B; e na terceira linha, com *Hind*III e *Bam*HI, formando uma banda de 660 pb correspondente ao fragmento A mais o B e uma de 2886 pb do vetor. Ao lado da imagem é mostrado um esquema com o vetor e o fragmento de DNA correspondentes; M, marcador molecular *1kb DNA ladder*.

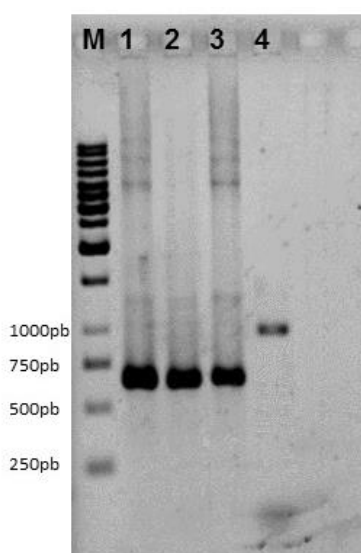


FIGURA 10. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EVIDENCIANDO COM A AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO pilTAB CLONADO. Confirmação pilTAB com tamanho de 660 pb nas linhas 1, 2 e 3; na linha 4 está a amplificação do gene *pilT* do *H. seropedicae* SmR1 selvagem, com um tamanho d

e 1191 pb. M, marcador molecular *1kb DNA ladder*.

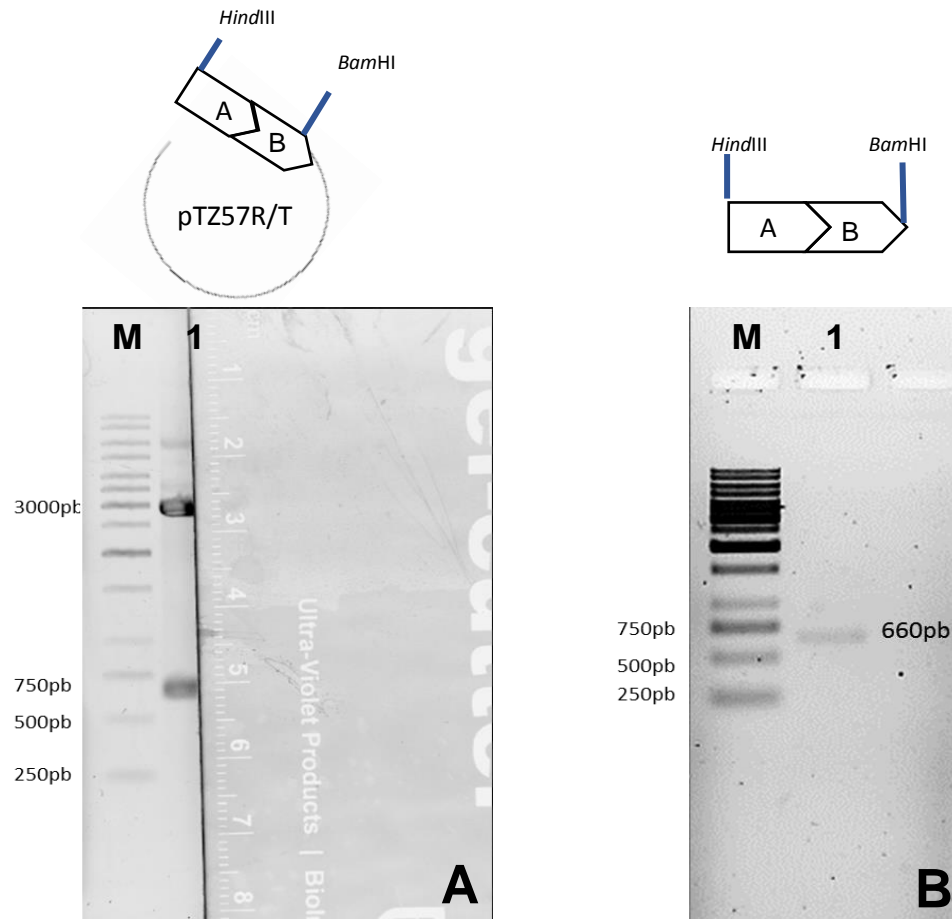


FIGURA 11. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EVIDENCIANDO A EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO *pi*TAB CLONADO NO VETOR PTZ57R/T PARA LIGAÇÃO NO PLASMÍDEO PSUP202. **(A)** Gel de agarose de baixo ponto de fusão; no poço 1, as bandas de 2.886 pb, correspondem ao vetor, e a banda de 660 pb, corresponde ao fragmento *pi*TAB; **(B)** gel de agarose mostrando o fragmento *pi*TAB (poço 1, banda de 660 pb) após o processo de extração e purificação; acima das imagens são mostrados esquemas com os fragmentos de vetor e DNA correspondentes; M, marcador molecular *1kb DNA ladder*.

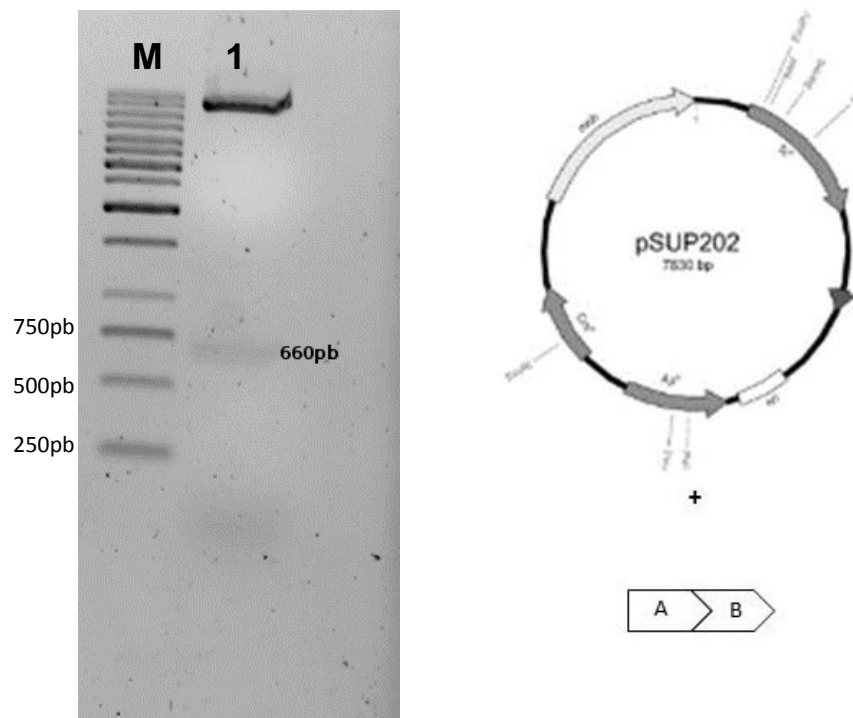


FIGURA 12. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% MOSTRANDO A RESTRIÇÃO DE MINI-PREP CONTENDO pSUP*pi*TAB. A banda de 660 pb, corresponde ao fragmento *pi*TAB, e o fragmento maior ao pSUP202. M, marcador molecular *1kb DNA ladder*. Ao lado da imagem é mostrado um esquema com o vetor e o DNA correspondente.

Nesta etapa foi adicionado à construção o marcador de seleção negativa, o cassete sacB-Km. Este marcador, possibilita a pressão de seleção negativa, permitindo a triagem das bactérias transformadas que carregam o gene deletado, integrado no genoma, sem o restante do vetor. O gene *sacB* foi isolado de *Bacillus subtilis* e na presença de sacarose no meio de cultura, codifica para uma enzima que forma polímeros de frutose no envelope celular que são liberados para o meio externo. Devido a presença de membrana externa e espaço periplasmático em bactérias gram-negativas, o acúmulo dos polímeros de frutose neste espaço acarreta a lise celular (GAY *et al.*, 1983). Dessa forma, um transconjugante de *H. seropedicae* contendo o cassete sacB-Km crescendo em meio contendo sacarose, irá morrer. Por outro lado, transconjugantes contendo somente a deleção no gene *pilT* sobreviverão em meio com sacarose, podendo ser selecionados para análise fenotípica.

Dessa forma, para permitir a seleção de pressão negativa, o cassete foi cortado do plasmídeo pMH1701 com a enzima *Bam*HI, e o fragmento de aproximadamente 4,0 Kb foi extraído e purificado do gel de agarose de baixo ponto de fusão (Figura 13). Em seguida, o cassete foi ligado ao plasmídeo pSUPpilTAB e eletroporado em *E.coli* DH10B. Dessa forma, as colônias obtidas tiveram o DNA extraído por purificação em larga escala e a construção foi confirmada pela digestão com *Hind*III e *Bam*HI, cujo produto resultou em fragmentos no gel de eletroforese com tamanhos equivalentes ao pSUP202, ao fragmento de 660 pb de pilTAB e ao sacB-Km dividido em duas partes (Figura 14, linha 1). Outra digestão foi realizada somente com *Bam*HI para confirmar a inserção do marcador de seleção negativa, uma vez que este apareceu cortado na primeira digestão; neste caso obteve-se o cassete sacB-Km (4 kb) e o plasmídeo pSUP202 ligado ao fragmento pilTAB (Figura 14, linha 2). Com o vetor pSUPpilTABsacBKm construído, este foi eletrotransformado em *E.coli* S17.1 para permitir a transferência do plasmídeo ao *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 por conjugação.

As colônias resultantes da conjugação, crescidas em meio NFbLPN contendo malato como fonte de carbono, na presença de cloranfenicol e canamicina, foram o resultado do primeiro evento de recombinação homóloga simples. Estes transconjugantes foram coletados e cultivados em meio líquido NFbHPN contendo malato como fonte de carbono, com o antibiótico estreptomicina, e por apresentarem uma cópia do gene selvagem e uma cópia do gene deletado, a ocorrência de um segundo evento de recombinação homóloga possibilitaria o surgimento de dois transconjugantes: um contendo o gene selvagem e outro o gene deletado. Para separar os dois eventos, as estirpes foram cultivadas em sacarose 10% e depois em canamicina. Devido a toxicidade do produto do gene *sacB*, dos transconjugantes que foram cultivados em sacarose, apenas aqueles que perderam o cassete foram capazes de crescer na presença do carboidrato e as bactérias sensíveis a

canamicina confirmaram a ocorrência do segundo evento de recombinação homóloga, em que houve a perda do cassete *sacB*-Km.

Para saber se as colônias transconjugantes que eram sensíveis a canamicina e cresciam na presença de sacarose continham a cópia do gene *pilT* selvagem ou deletada, foram realizadas amplificações com os oligonucleotídeos iniciadores *pilT* E1 F e *pilT* E3 R, onde se esperava encontrar a cópia do gene deletado de 660 pb, ou selvagem de 1.191 pb. De aproximadamente 500 colônias testadas, apenas 8 apresentavam o perfil de gene deletado. Em duas destas estirpes foi detectado a presença de uma banda difusa e pouco visível, correspondente ao tamanho do gene selvagem, o que levou a dúvidas em relação a esses dois mutantes (Figura 15 A e B).



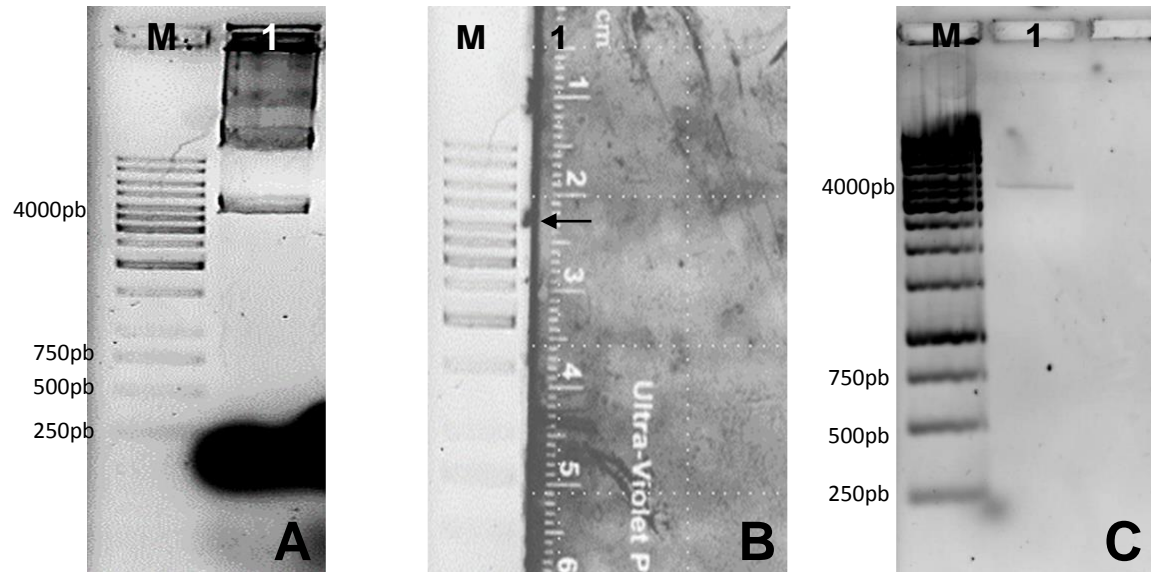


FIGURA 13. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EVIDENCIANDO A EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO CASSETE *sacB*-Km CLONADO NO VETOR pMH1701 PARA LIGAÇÃO NO PLASMÍDEO pSUP202. **(A)** Gel de agarose com a restrição do plasmídeo pMH1701; **(B)** Gel de agarose de baixo ponto de fusão; no poço 1, as bandas de ~4,0 Kb, correspondem ao cassete *sacB*-Km; **(C)** Gel de agarose após o processo de extração e purificação contendo somente o cassete *sacB*-Km; M, marcador molecular *1kb DNA ladder*.

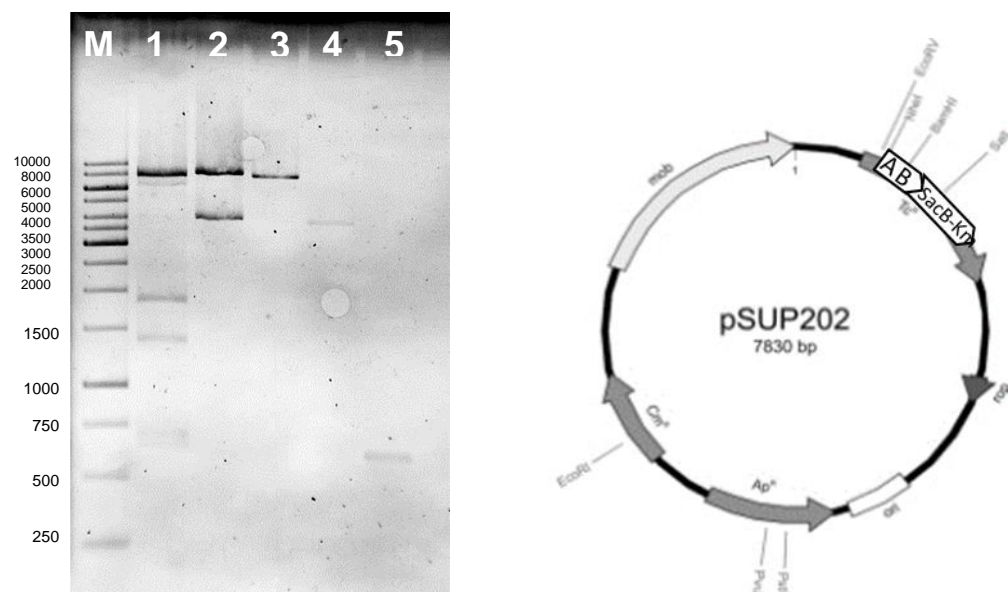


FIGURA 14. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EVIDENCIANDO A CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO pSUP*pilTABsacBKm*. **Linha 1:** digestão com *Hind*III e *Bam*HI gerou fragmentos no gel de eletroforese com tamanhos equivalentes ao pSUP202, ao fragmento de 660 pb de *pilTAB* e ao *sacB*-Km dividido em duas partes. **Linha 2:** digestão feita somente com *Bam*HI para confirmar a inserção do marcador de seleção negativa, uma vez que este apareceu cortado na primeira digestão; neste caso obteve-se o cassete *sacB*-Km (4 kb) e o plasmídeo pSUP202 ligado ao fragmento *pilTAB*. **Linha 3:** plasmídeo pSUP202 aberto; **Linha 4:** cassete *sacB*-Km purificado; **Linha 5:** fragmento *pilTAB*. M, marcador molecular *1kb DNA ladder*. Ao lado da imagem é mostrado um esquema da montagem do vetor concluída.



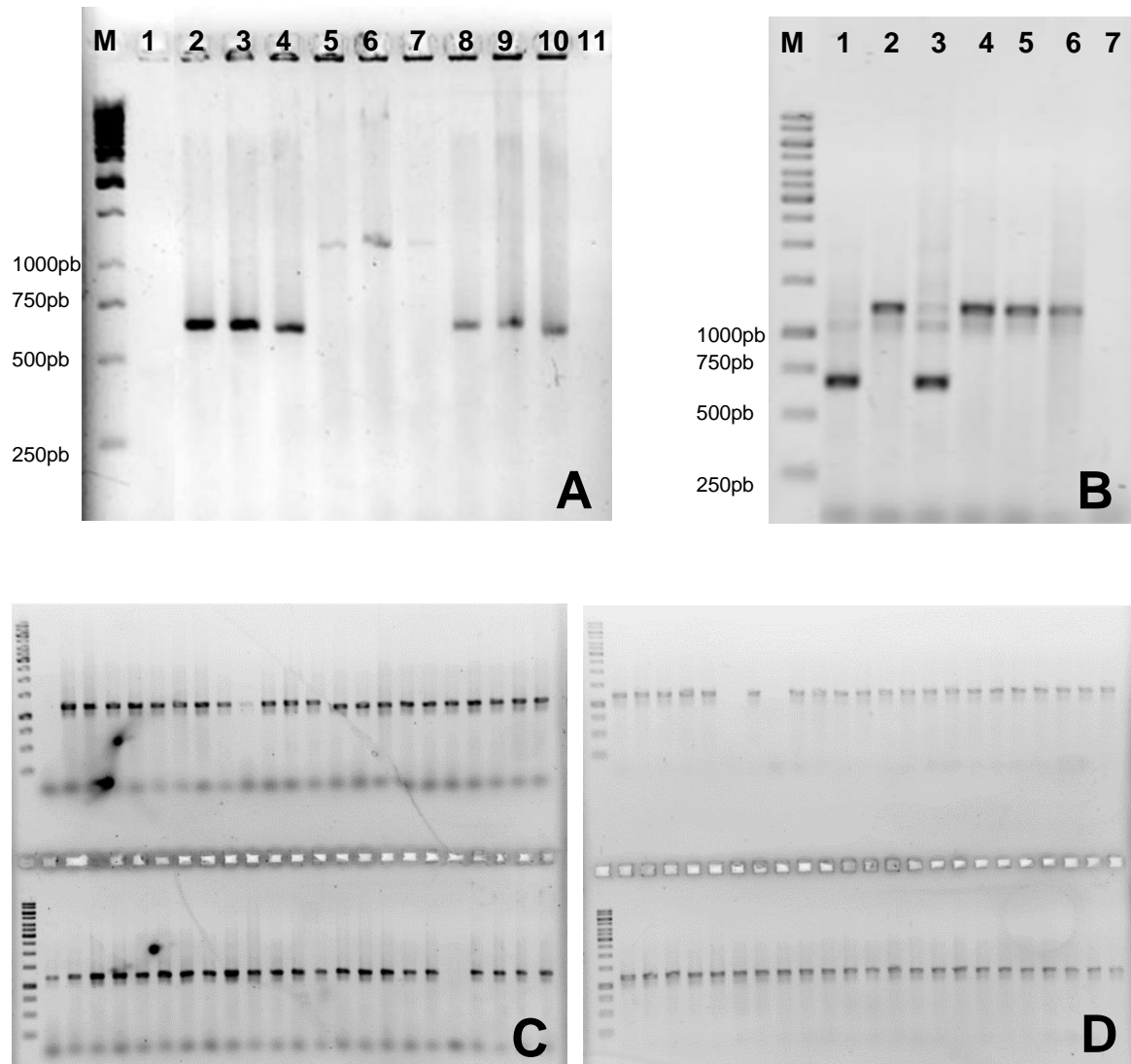


FIGURA 15. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% MOSTRANDO AMPLIFICAÇÃO DE COLÔNIAS OBTIDAS APÓS SELEÇÃO EM SACAROSE E CANAMICINA (SEGUNDO EVENTO DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA). Em **A**, nas linhas 2,3,4,8,9 e 10 aparecem perfis de possíveis mutantes (660 pb), e em **B**, nas linhas 1 e 3; **C** e **D** são amplificações que não resultaram em mutantes.

## 7. TESTE FENOTÍPICO DOS MUTANTES DE *Herbaspirillum seropedicae* PARA O GENE *pilT*

Para testar o fenótipo do mutante *pilT* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 analisou-se o *twitching motility* inoculando as bactérias em placa de ágar, e observou-se nas imagens da Figura 16 que o crescimento do mutante foi bem semelhante ao da estirpe selvagem. Não é possível observar com clareza a presença do *twitching motility* através da zona de espalhamento com formação de halo, não havendo diferença entre as colônias das estirpes selvagem e mutante. Não há dados que indiquem que o T4P seja expresso em *H. seropedicae* quando esta bactéria não está associada a planta, podendo ser um indicativo da ausência de fenótipo nas condições testadas.

As bactérias mutantes do gene *pilT* tendem a ser hiperpiliadas, pois o *pili* é produzido mas não desmontado o que afeta diretamente a motilidade *twitching*, uma vez que *pilT* funciona como o principal motor retrátil do *pili* (MATTICK, 2002; MERZ, SO & SHEETZ, 2000; WOLFGANG *et al.*, 1998; WHITCHURCH *et al.*, 1991). Dessa forma, em muitos organismos que tiveram o *pilT* mutado a ocorrência do *twitching motility* foi verificada através da análise morfológica das bordas da colônia, bem como pela presença de uma zona de espalhamento na periferia da colônia em placa de ágar, que eram facilmente detectáveis nos selvagens, mas nos mutantes eram reduzidas ou ausentes, e/ou apresentavam borda diferente da do selvagem como nos casos de *Pseudomonas aeruginosa* (SATYSHUR *et al.*, 2007; AUKEMA *et al.*, 2005; WHITCHURCH & MATTICK, 1994), *Neisseria gonorrhoeae* (WOLFGANG *et al.*, 1998) *Myxococcus xanthus* (JAKOVLJEVIC *et al.*, 2008), *Neisseria meningitidis* (PUJOL *et al.*, 1999), *Azoarcus* (BÖHM *et al.*, 2007), *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (BAHAR *et al.*, 2009) e *Ralstonia solanacearum* (LIU *et al.*, 2001).

Em testes de *twitching motility* realizados em placa de ágar, *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, apresentaram zonas de *twitching* sobre ágar tão pequenas que chegavam a ser quase invisíveis (HENRICHSEN, 1975), podendo a ocorrência de *twitching motility* ser variável em diferentes espécies e/ou as condições de cultura *in vitro* serem abaixo do ideal para este processo ser ativado (MATTICK *et al.*, 1987; HENRICHSEN, 1983). Este pode ser um dos motivos de não se conseguir observar as zonas de *twitching motility* em *H. seropedicae*; talvez ao analisar as estirpes selvagem e mutante associadas a planta, a expressão do *pili* seja ativada e o *twitching motility* possa ser observado.

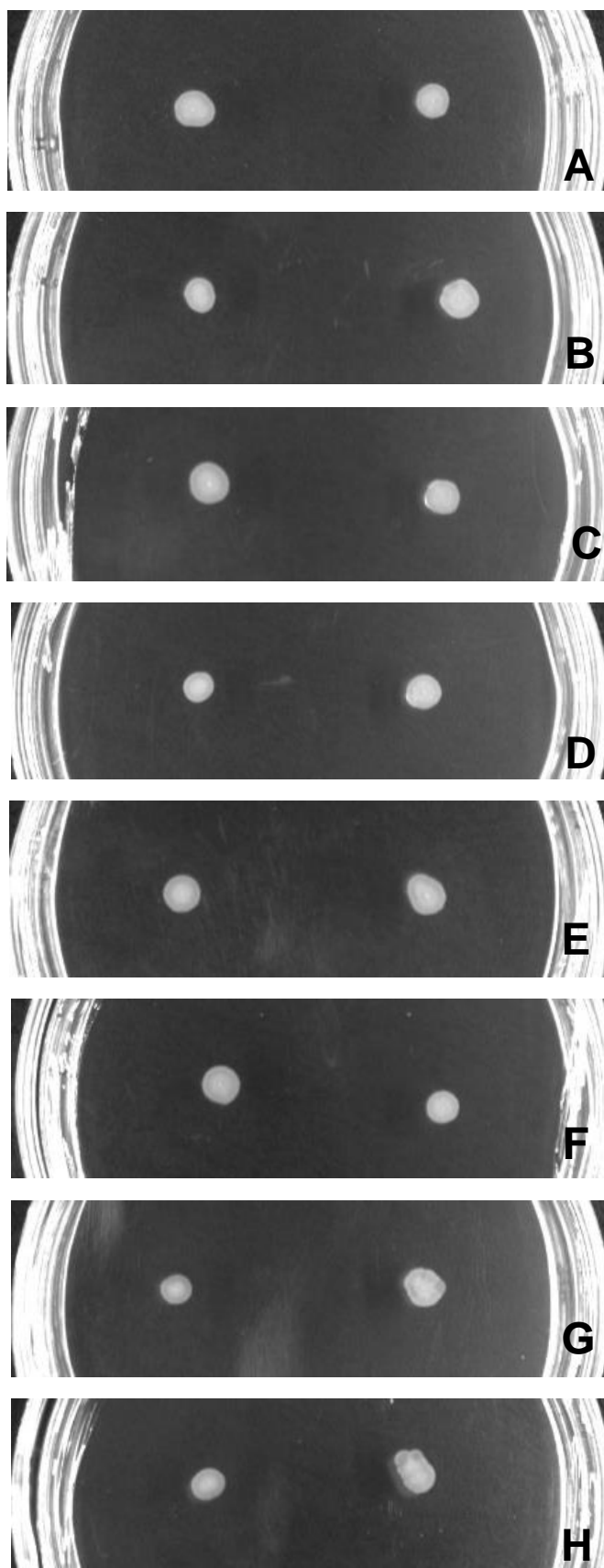


FIGURA 16. ENSAIO DE *TWITCHING MOTILITY*. Ágar 1,5%. As colônias à esquerda se referem à estirpe selvagem *H. seropedicae* SmR1. À direita A) - *pilT1*; B) - *pilT2*; C) - *pilT3*; D) - *pilT4*; E) - *pilT5*; F) - *pilT6*; G) - *pilT7*, H) - *pilT8*.

### 7.1. ENSAIOS EM *Vigna unguiculata*

*H. rubrisubalbicans* M1 é um fitopatógeno que causa a doença da estria mosqueada em cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) e também a doença da estria vermelha em algumas variedades de sorgo (*Sorghum bicolor*) (OLIVARES *et al.*, 1997; JAMES *et al.*, 1997). Schmidt e colaboradores (2012) mostraram que ao infiltrar  $10^8$  UFC/mL células de *H. rubrisubalbicans* M1 nas folhas de *Vigna unguiculata*, houve o aparecimento de lesão nas folhas. Os primeiros sinais de tecido lesionado começaram a aparecer após 48 horas da infiltração, e com 10 dias a região infiltrada apresentava necrose, rodeada por grandes halos de clorose, seguido do desprendimento da folha da planta.

*Herbaspirillum* spp. foram infiltradas nas folhas de *Vigna unguiculata* com o intuito de verificar se seriam capazes de: i) colonizar endofiticamente a planta; ii) induzir uma resposta na planta, semelhante a observada para *H. rubrisubalbicans* M1 (fitopatogênica) ou iii) não induzir resposta pela planta, como ocorre na colonização por *H. seropedicae* SmR1 (não fitopatogênica).

Após 10 dias da infiltração das espécies de *Herbaspirillum* na planta, as folhas inoculadas foram fotografadas e as imagens obtidas estão apresentadas na Figura 17. Como controle interno, foi utilizada folhas infiltradas com solução de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 10,0 mmol/L, como controle negativo o *H. seropedicae* SmR1 (não fitopatogênico) e como controle positivo, o *H. rubrisubalbicans* M1 (fitopatogênico). Nas folhas infiltradas com *Herbaspirillum* spp. não foi observado os mesmos sintomas causados pelo controle positivo *H. rubrisubalbicans* M1, entretanto, foram observados sintomas diferenciados em relação ao controle negativo, infiltrado com *H. seropedicae* SmR1. A característica para a inoculação com *H. rubrisubalbicans* M1 é a formação de áreas de necrose na folha, no entanto, nenhum tratamento apresentou esse sintoma, mas apresentaram pontos de clorose na folha, enrugamento e deformação da folha. Essas mudanças podem ter sido causadas por algum fator ainda desconhecido.

*Herbaspirillum hiltneri* N3 (Figura 17D) apresentou maior grau de dano seguida de *Herbaspirillum huttiense* subsp. *huttiense* 266 (Figura 17C). Além disso, é possível notar nas imagens que somente o *Herbaspirillum lusitanum* (Figura 17H) não apresentou nenhum tipo de reação aparente. No estudo de Schmidt e colaboradores (2012), foram testados mutantes de *H. rubrisubalbicans* M1 de genes do sistema de secreção do Tipo III (SST3), os quais demonstraram não apresentar sintomas de doença nas folhas infiltradas, sendo determinado que a presença desse sistema é muito importante para o estabelecimento das interações patogênicas. Em uma análise do genoma foi possível verificar que algumas espécies de *Herbaspirillum* apresentam o sistema de secreção do Tipo III (Tabela 1), no entanto, *H. seropedicae* também apresenta esse sistema e não causa nenhum tipo de lesão

na planta; do mesmo modo, *H. lusitanum* também possui os genes desse sistema, mas não mostrou resposta em *Vigna unguiculata*. Entre as espécies que induziram resposta e possuem genes para este sistema de secreção está *H. chlorophenolicum* (Tabela 1 e Figura 17B). Um estudo realizado por Balsanelli (2013) avaliando o transcriptoma de *H. seropedicae* associado a rizosfera de milho, verificou que os genes do SST3 não foram expressos em nenhuma das condições testadas no trabalho. Dessa forma, é necessário considerar que há espécies de *Herbaspirillum* que não possuem o SST3 e mesmo assim resultaram em algum tipo de lesão na folha, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos neste tipo de associação.

Além de analisar as folhas, as células infiltradas foram recuperadas e contadas. Não houve correlação entre os sintomas observados e a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), com *H. hiltneri* N3 apresentando maior grau de dano nas folhas e baixa contagem de UFC; *H. huttiense* subsp. *huttiense* 266 apresentando um grau de dano menor nas folhas e alta contagem de UFC. A contagem de *H. rubrisubalbicans* M1 ficou em valor intermediário, mas superior ao observado para *H. seropedicae* SmR1. É importante notar ainda que, apesar dos valores de contagem de UFC variarem, os resultados indicam que todas as espécies testadas são capazes de colonizar endofiticamente a planta, com a maioria delas atingindo  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>.

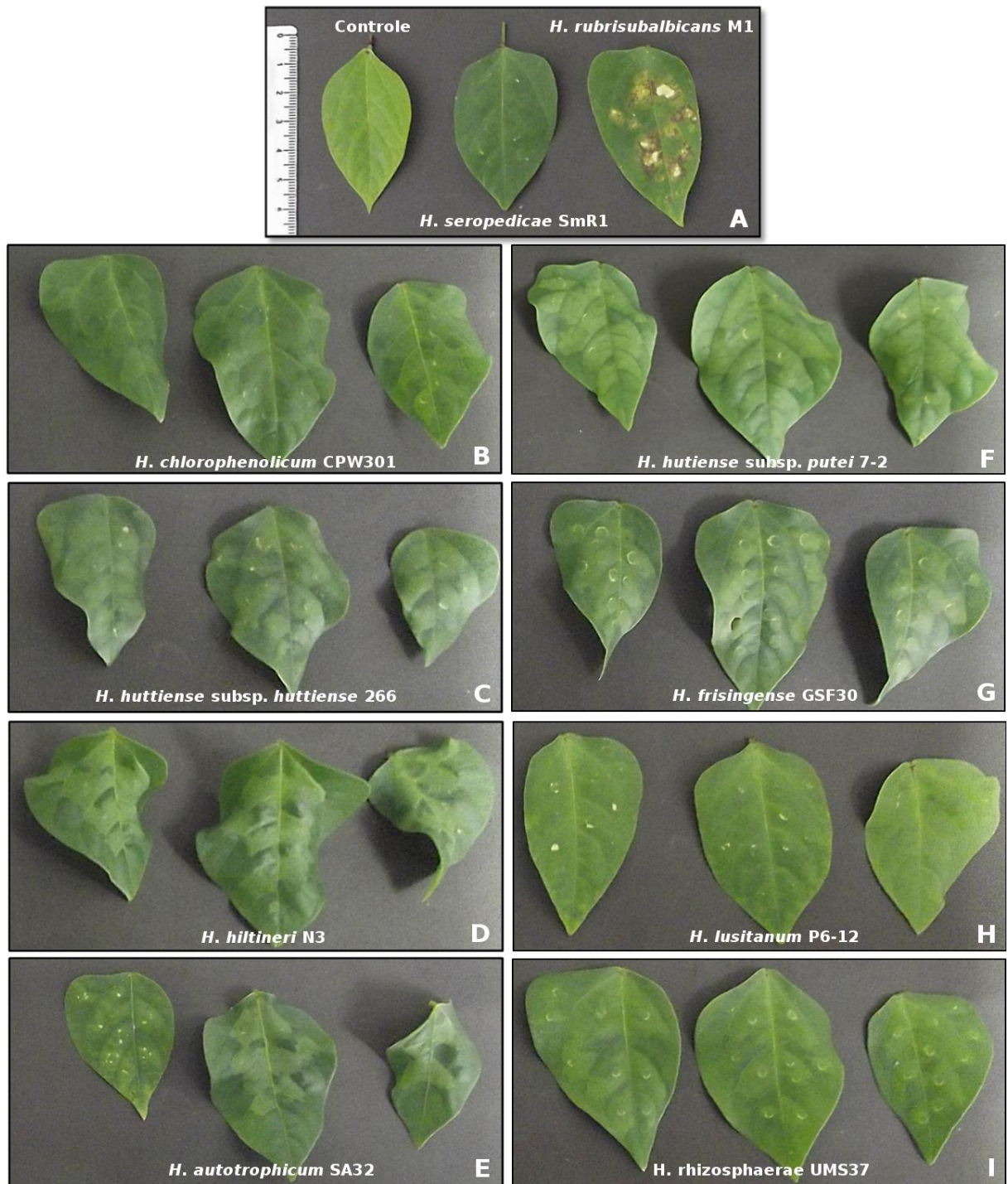


FIGURA 17. FOLHAS DE *Vigna unguiculata* INFILTRADAS COM *Herbaspirillum* spp.

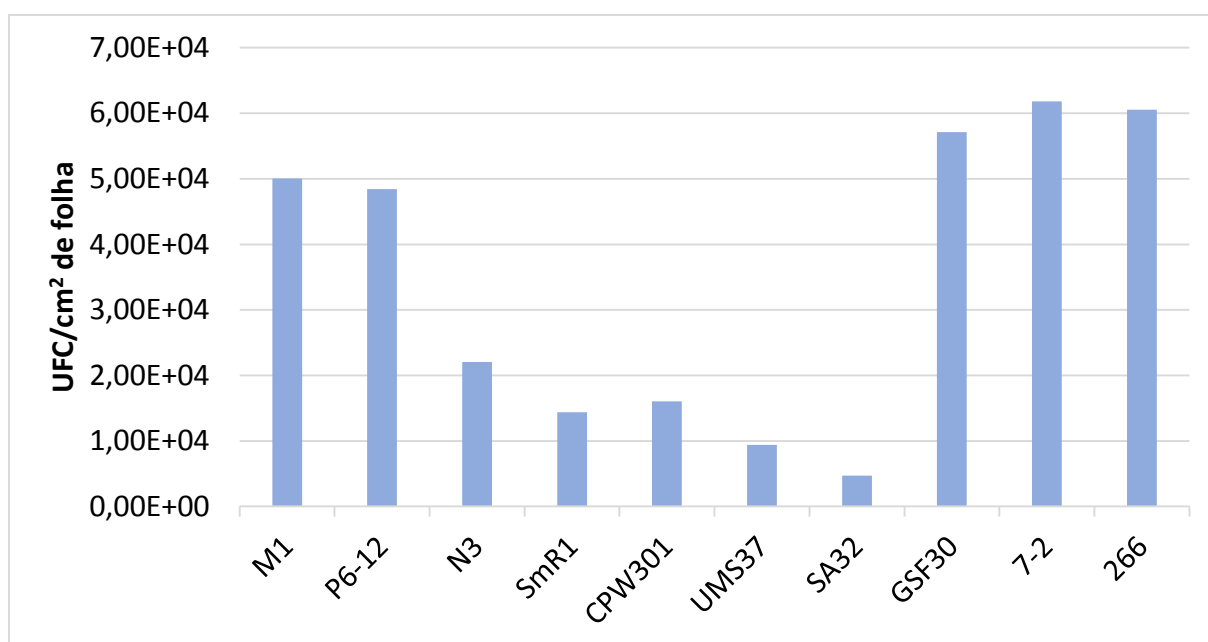


FIGURA 18 - GRÁFICO DO NÚMERO DE CÉLULAS DE *Herbaspirillum* spp. RECUPERADAS DE FOLHA DE *Vigna unguiculata*.

## 8. CONCLUSÕES

- *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 possui 29 genes ortólogos aos genes envolvidos na biogênese do sistema *pili* Tipo IV;
- *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 possui na proteína PilT, quatro motivos bem conservados nas sequências de aminoácidos comuns nesta proteína (Walker boxes A e B, Asp e His boxes). No entanto, o domínio C-terminal que é comumente conservado em muitas espécies não se mostrou muito conservado em *H. seropedicae*. A proteína PilT de *H. seropedicae* apresenta 31,5% de similaridade com a de *P. aeruginosa*.
- O mutante com o gene *pilT* deletado foi construído para *H. seropedicae* SmR1;
- O mutante com a deleção no gene *pilT*, não mostrou fenótipo diferente da estirpe selvagem nos testes realizados;
- As espécies *Herbaspirillum huttiense* subsp. *huttiense* 266, *Herbaspirillum autotrophicum* SA32, *Herbaspirillum huttiense* subsp. *putei* 7-2, *Herbaspirillum frisingense* GSF30, *Herbaspirillum chlorophenolicum* CPW301, *Herbaspirillum hiltneri* N3 e *Herbaspirillum rhizosphaerae* UMS37 foram capazes de induzir resposta quando inoculadas em folhas da leguminosa *Vigna unguiculata*;
- *Herbaspirillum lusitanum* não foi capaz de induzir resposta quando inoculado em folhas da leguminosa *Vigna unguiculata*.



## 9. REFERÊNCIAS

- AAS, F. E.; LOVOLD, C.; KOOMEY, J. M. An inhibitor of DNA binding and uptake events dictates the proficiency of genetic transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: mechanism of action and links to type IV pilus expression. **Mol. Microbiol.**, v. 46, p. 1441–1450, 2002.
- ALM, R. A.; MATTICK, J. S. Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. **Gene**, v. 192, p. 89–98, 1997.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ANANDHAM, R.; KIM, S.-J.; MOON, J. Y.; WEON, H.-Y.; KWON, S.W. *Paraherbaspirillum soli* gen. nov., sp. nov. Isolated from Soil. **Journal of Microbiology**. v. 51, n.2, p. 262–26, 2013.
- ARAGNO, M.; SCHLEGEL, H. G. *Aquaspirillum autotrophicum*, a new species of hydrogen-oxidizing, facultatively autotrophic bacteria. **J Syst Bacteriol** v. 28, p. 112–116, 1978.
- AUKEMA, K.; KRON, E. M.; HERDENDORF, T. J.; FOREST, K. T. Functional dissection of a conserved motif within the pilus retraction protein PilT. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 611–618, 2005.
- AVERHOFF, B.; FRIEDRICH, A. Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria. **Arch. Microbiol.**, v. 180, p. 385–93, 2003.
- BAE, H.S.; LEE, J. M.; KIM, Y. B.; LEE, S. T. Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. **Biodegradation**, v.7, p. 463–469, 1996.
- BAHAR, O.; DE LA FUENTE, L.; BURDMAN, S. Assessing adhesion, biofilm formation and motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.**, v. 312, p. 33-39, 2010.
- BAHAR, O.; GOFFER, T.; BURDMAN, S. Type IV pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v, 22, p. 909-920, 2009.
- BAJERSKI, F.; GANZERT, L.; MANGELSDORF, K.; BAJERSKI, F., GANZERT, L., MANGELSDORF, K., LIPSKI, A., BUSSE, H.-J., PADUR, L., & WAGNER, D. *Herbaspirillum psychrotolerans* sp. nov., a novel member of the family Oxalobacteraceae from a glacier

forefield of the Larsemann Hills, East Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2013.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Genu *Herbaspirillum*. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 2003.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biol. Biochem**, v. 29, n. 5/ 6, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillumseropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J.Syst. Bacteriol.**, v.36, p.86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillumrubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.46, p.802-810, 1996.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER; J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65–7, 1992.

BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER; J. Selection of *Herbaspirillum* spp. strains associated with rice seedlings amended with <sup>15</sup>N- labelled fertiliser. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics – the role of biological nitrogen fixation. Resumos**. Angra dos Reis: EMBRAPA, p. 202-203, 1995.

BALSANELLI, E. **Caracterização de fatores moleculares envolvidos na interação de *Herbaspirillum seropedicae* com gramíneas**. Curitiba, 160 p. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. 2013.

BALSANELLI, E.; SERRATO, R.V.; BAURA, V.A.; SASSAKI, G.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A. *Herbaspirillum seropedicae* *rffB* and *rffC* genes are required for maize colonization. **Environ Microbiol**, v.12, p. 2233– 2244, 2010.

BALSANELLI, E.; BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A. Exopolysaccharide Biosynthesis Enables Mature Biofilm Formation on Abiotic Surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*. **PLoS ONE**, v.9, ed. 10, e110392, p. 1-10, 2014.

BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, E.L.; BALDANI, V.L.D. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice : Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v. 174, p. 195-209, 1995.

BOHM, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N<sub>2</sub>-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 20, p. 526–533, 2007.

BRADLEY, D.E. A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. **Canadian journal of microbiology**, v. 26, p. 146–154, 1980.

BRADLEY, D.E. Evidence for the retraction of *Pseudomonas aeruginosa* RNA phage pili. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.47, p. 142–149, 1972a.

BRADLEY, D.E. Shortening of *Pseudomonas aeruginosa* pili after RNA-phage adsorption. **J. Gen. Microbiol.**, v. 72, p. 303–319, 1972b.

BROUGHTON, W.J.; DILWORTH, M.J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Biochem. J.** v.125, p. 1075-1080, 1971.

BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 493–520, 2012.

CAMPANA, S.; TACCETTI, G.; RAVENNI, N.; FAVARI, F.; CARIANI, L.; *et al.* Transmission of *Burkholderia cepacia* Complex: Evidence for New Epidemic Clones Infecting Cystic Fibrosis Patients in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5136-5142, 2005.

CARRO, L.; RIVAS, R.; LÉON-BARRIOS, M.; GONZÁLEZ-TIRANTE, M.; VELÁZQUEZ, E.; VALVERDE, A. *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., three new species isolated in Tenerife (Canary Islands). **IJSEM Papers in Press**. 2011.

CHEN, J.; SU, Z.; LIU, Y.; SANDOGHCHIAN, S.; ZHENG, D.; WANG, S.; XU, H. *Herbaspirillum* Species: A Potencial Pathogenic Bacteria Isolated from Acute Lymphoblastic Leukemia Patient. **Curr Microbiol.**, v. 62, p. 331-333, 2011.

CHIANG, P.; SAMPALEANU, L. M.; AYERS, M.; PAHUTA, M.; HOWELL, P. L.; BURROWS, L. L. Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU. **Microbiology**, v.154, p.114–126, 2008.

COENYE, T.; GORIS, J.; SPILKER, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.J. Characterization of Unusual Bacteria Isolated from Respiratory Secretions of Cystic Fibrosis Patients and

Description of *Inquilinus limonus* gen. nov., sp. nov. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2062-2069, 2002.

CRAIG, L.; LI, J. Type iv pili: paradoxes in form and function. **Curr Opin Struct Biol**, v.18, p. 267–77, 2008.

CRAIG, L.; PIQUE, M. E.; TAINER, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 363–378, 2004.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comusus* (L.) Merrill). **Appl. Environ. Microbiol.** v. 67, p. 2375–3279, 2001.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibactergracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillumputei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillumhuttiense* comb. nov., *Curvibacterlanceolatus* comb. nov., *Curvibacterdelicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.54, p.2223-2230, 2004.

DOBRITSA, A. P.; REDDY, M. C. S.; SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense* and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **IJSEM Papers in Press**. 2010.

DÖRR, J.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Type IV pili are involved in plant–microbe and fungus–microbe interactions. **Molecular Microbiology**, v. 30, n .1, p. 7–17, 1998.

DUBNAU, D. DNA uptake in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 217– 244, 1999.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, M. Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5285-5293, 2001.

GAY, P., LE COQ, D., STEINMETZ, M., FERRARI, E., HOCH, J.A. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *B. subtilis*: expression of the gene in *E. coli*. **J. Bacteriol.**, v. 153, p. 1424-1431, 1983.

GROOT, A.; HEIJNEN, I.; COCK, H.; FILLOUX, A.; TOMMASSEN, J. Characterization of type IV pius genes in plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. **J Bacteriol.**, v. 176, p. 642-650, 1994.

GULATI, A.; SOOD, S.; RAHI, P.; THAKUR, R.; CHAUHAN, S.; CHADHA, I.C. Diversity Analysis of Diazotrophic Bacteria Associated with the roots of Tea (*Camellia sinensis*) (L.) O. Kuntze). **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21, p. 545-555, 2011.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M.; LADHA, J. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p. 131-145, 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 41, p. 95-98, 1999.

HAN, X.; KENNAN, R.M.; PARKER, D.; DAVIES, J.K.; ROOD, J.I. Type IV fimbrial biogenesis is required for protease secretion and natural transformation in *Dichelobacter nodosus*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 5022–5033, 2007.

HENRICHSEN, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. **Bacteriol. Rev.**, v. 36, p. 478–503, 1972.

HENRICHSEN, J. The occurrence of twitching motility among Gram-negative bacteria. **Acta Pathol Microbiol Scand Sect B**, v. 83, p. 171–178, 1975.

HENRICHSEN, J. Twitching motility. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 81–93, 1983.

HEYDORN, A.; ERSBOLL, B.; KATO, J.; HENTZER, M.; PARSEK, M.R.; TOLKER-NIELSEN, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. Statistical Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development: Impact of Mutations in Genes Involved in Twitching Motility Cell-to-Cell Signaling, and Stationary-Phase Sigma Factor Expression. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2008–2017, 2002.

HYNES, M. F. *et al.* Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. *Gene*, v. 78, n. 1, p. 111- 120, May 1989.

IM, W.T., BAE, H.S.; YOKOTA, A.; LEE, S.T. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.54, p.851-855, 2004.

ISHII, S.; OHNO, H.; TSUBOI, M.; OTSUKA, S.; SENOO, K. Identification and isolation of active N<sub>2</sub>O reducers in rice paddy soil. **The ISME Journal**, v.5, p. 1936-1945, 2011.

JAKOVLJEVIC, V.; LEONARDY, S.; HOPPERT, M.; SOGAARD-ANDERSEN, L. PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pili function in *Myxococcus xanthus*. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 2411–2421, 2008.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci**, v. 17, p. 77-119, 1998.

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N. Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promotion Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 15, n. 9, p. 894-906, 2002.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 308, p. 785-797, 1997.

JUNG, S. Y.; LEE, M. H.; OH, T. K.; YOON, J. H.; *Herbaspirillum rhizopherae* sp. Nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *Platyphyllum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2284-2288, 2007.

KAISER, D. Bacterial motility: How do pili pull? **Curr. Biol.**, v. 10, p. 777– 780, 2000.

KANG, Y.; LIU, H.; GENIN, S.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 46, p. 427- 437, 2002.

KARUPPIAH, V.; HASSAN, D.; SALEEM, M.; DERRICK, J.P. Structure and oligomerization of the PilC type IV pilus biogenesis protein from *Thermus thermophilus*. **Proteins**. v. 78, p. 2049–57, 2010.

KIM, B.; LEE, S.; SONG, M.; CHOI, J.; AHN, S.; LEE, K.; CHO, E.; CHON, T.; KOH, S. Implementation of artificial neural networks (ANNs) to analysis of inter-taxa communities of benthic microorganisms and microinvertebrates in a polluted stream. **Science of the Total Environment**, v. 390, p. 262-274, 2008

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C<sub>4</sub>-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.157-168, 2001.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biol. Biochem.** v.29, n.5/6, p.853-862, 1997.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. **Can J Microbiol.**, v.43, p.841-846, 1997.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In BROWN, T. A., **Essential Molecular Biology: A Practical Approach**, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.

KOO, J.; TAMMAM, S.; KU, S.Y.; SAMPALEANU, L.M.; BURROWS, L.L.; HOWELL, P.L. PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *J. Bacteriol.*, v. 190, p. 6961–6969, 2008.

LAGIER, J. C.; GIMENEZ, G.; ROBERT, C.; RAOULT, D.; FOURNIER, P.-E. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Herbaspirillum massiliense* sp. nov. **Standards in Genomic Sciences**. v.7, p. 200-209, 2012.

LAPOINTE, C.F., TAYLOR, R.K. The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p.1502–1510, 2000.

LEIFSON, E. The bacterial flora of distilled and stored water. III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon*, v.12, p. 161–170, 1962.

LI, Y.; HAO, G.; GALVANI, C. D.; MENG, Y.; DE LA FUENTE, L.; HOCH, H. C.; BURR, T. J. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. **Microbiology**, v. 153, p. 719-726.

LIN, S.-H.; HAMEED, A.; ARUN, A. B.; LIU, Y.-C.; HSU, Y.-H.; LAI, W.-A.; REKHA, P. D.; YOUNG, C.-C. Description of *Noviherbaspirillum malthae* gen. nov., sp. nov. isolated from an oil contaminated soil, and proposal to reclassify *Herbaspirillum soli*, *Herbaspirillum aurantiacum*, *Herbaspirillum canariense* and *Herbaspirillum psychrotolerans* into the genus *Noviherbaspirillum* based on polyphasic analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2013.

LIU, H.; KANG, Y.; GENIN, S.; SCHELL, M. A.; T. P. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. **Microbiology**, v.147, p. 3215-3229, 2001.

LORY, S.; STROM, M.S. Structure-function relationship of type-IV prepilin peptidase of *Pseudomonas aeruginosa* – a review. **Gene**, v. 192, p. 117– 121, 1997.

LU, H.; FUJIMURA, R.; SATO, Y.; NANBA, K.; KAMIJO, T.; OHTA, H. Characterization of *Herbaspirillum*-and *Limnobacter* - Related Strains Isolated from Young Volcanic Deposits in Miyake-Jima Island, Japan. **Microbes. Environ.** v. 23, p.66-72, 2008.

MARQUES, A. C. Q.; PALUDO, K. S.; DALLAGASSA, C. B.; SUREK, M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; CRUZ, L. M.; LIPUMA, J. J.; ZANATA, S. M.; REGO, F. G. M.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Biochemical characteristics, adhesion and cytotoxicity of environmental and clinical isolates of *Herbaspirillum* spp. **J. Clin. Microbiol.** 2014.

MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. **Annu. Rev. Microbiol**, n. 56, p.289–314, 2002.

MATTICK, J. S.; ALM, R. A. Common architecture of type 4 fimbriae and complexes involved in macromolecular traffic. **Trends Microbiol.**, v. 3, p. 411-413, 1995.

MATTICK, J.S., BILLS, M.M., ANDERSON. B.J., DALRYMPLE. B., MOTL. M.R.; EGERTON, J.R. Morphogenetic expression of *Bacteroides nodosus* fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol.**, v.169, p. 33-41, 1987.

MELVILLE, S.; CRAIG, L. Type IV Pili in Gram-Positive Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 3, p. 323–341, 2013.

MENG, Y.; LI, Y.; GALVANI, C.D.; HAO, G.; TURNER, J.N.; BURR, T.J.; HOCH, H.C. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. **J Bacteriol.**, v. 187, p.5560-5567, 2005.

MERZ, A.J.; SO, M.; SHEETZ, M.P. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. **Nature**, v. 407, p.98– 102, 2000.

MORAND, P.C.; BILLE, E.; MORELLE, S.; EUGENE, E.; BERETTI, J.L.; WOLFGANG, M.; MEYER, T.F.; KOOMEY, M.; NASSIF, X. Type IV pilus retraction in pathogenic *Neisseria* is regulated by the PilC proteins. **EMBO**, v. 23, p. 2009–2017, 2004.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 295–304, 1998.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol**, v. 135, p. 723–737, 1997.

OLIVARES, F. L.; JANES, E. K.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.;

DOBEREINER, J. Colonization of vascular tissue by *Herbaspirillum* spp. in *Sorghum* and sugarcane, **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 313, 1993.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. **Biol Fertil Soils**, v. 21, p. 197–200, 1996.

PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; AYUB; R.A; *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genet**, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2011.



PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil** 137, 61-5, 1991.

PLANET, P. J.; KACHLANY, S. C.; DESALLE, R.; FIGURSKI, D. H. Phylogeny of genes for secretion NTPases: Identification of the widespread *tadA* subfamily and development of adiaagnostic key for gene classification. **PNAS**, v. 98, n. 5, p. 2503–2508, 2001.

PUJOL, C.; EUGENE, E.; MARCEAU, M.; NASSIF, X. The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 4017–22, 1999.

REGUERA, G.; MCCARTHY, K.D.; MEHTA, T.; NICOLL, J.S.; TUOMINEN, M.T.; LOVLEY, D.R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. **Nature**, v. 435, p. 1098–1101, 2005.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Curr Opin Plant Biol**, v. 14, p. 435–443, 2011.

REINHOLD-HUREK, B.; MAES, T.; GEMMER, S.; VAN MONTAGU, M.; HUREK T. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. BH72. **Mol Plant–Microbe Interact.**, v. 19, p. 181-188, 2006.

RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.275-284, 2006.

ROINE, E.; RAINERI, D. M.; ROMANTSCHUK, M.; WILSON, M.; NUNN, D. N. Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 11, p. 1048-1056, 1998.

ROMANTSCHUK, M.; BAMFORD, D. H. The causal agent of halo blight in bean, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, attaches to stomata via its pili. **Microb. Pathog.**, v.1, p. 139-148, 1986.

RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R. AND SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 39-47, 2003.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **Int.J. Syst. Evol. Microbiol.** v.56, p.1341-1348, 2006.

ROTHBALLER, M.; ECKERT, B.; SCHMID, M.; FEKETE, A.; SCHLOTER, M.; LEHNER, A.; POLLMANN, S.; HARTMANN, A. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 66, p. 85–95, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. **Cold Spring Harbor**, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SATYSHUR, K. A.; WORZALLA, G. A.; MEYER, L. S.; HEINIGER, E. K.; AUKEMA, K. G.; MISIC, A. M.; FOREST, K. T. Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility. **Structure**, v. 15, p. 363–376, 2007.

SCHMIDT, M.A.; BALSANELLI, E.; FAORO, H.; CRUZ, L.M.; WASSEM, R.; BAURA, V.A.; WEISS, V.; YATES, M.G.; MADEIRA, H.M.F.; PEREIRA-FERRARI, L.; FUNGARO, M.H.P.; PAULA, F.M.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L.G.E.; OLIVARES, F.L.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A. The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Poaceae. **BMC Microbiology**, v.12, n.98, p 1-10, 2012.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PULHER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria, **Biotechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.

SKERKER, J. M.; BERG, H. C. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 6901–6904, 2001.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

SPIPKER, T.; ULUER, A.Z.; MARTY, F.M.; YEH, W.W.; LEVISON, J.H.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.J. Recovery of *Herbaspirillum* Species from Persons with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2774-2777, 2008.

STRAUB, D.; ROTHBALLER, M.; HARTMANN, A.; LUDEWIG, U. The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30<sup>T</sup> identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. **Frontiers in Microbiology**, p. 1-10, 2013b.

STRAUB, D.; YANG, H.; TSAP, T.; LUDEWIG, U. Root ethylene signalling is involved in *Miscanthus sinensis* growth promotion by the bacterial endophyte *Herbaspirillum frisingense* GSF30. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 14, p. 4603–4615, 2013a.

STROM, M. S.; NUNN, D.; LORY, S. Multiple roles of the pilus biogenesis protein PilD: involvement of PilD in excretion of enzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 1175–1180, 1991.

SUN, H.; D. R. ZUSMAN; SHI, W. Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. **Curr. Biol.**, v. 10, p. 1143–1146, 2000.

TAGUCHI, V.; ICHINOSE, Y. Role of Type IV Pili in Virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: Correlation of Motility, Multidrug Resistance, and HR-Inducing Activity on a Nonhost Plant. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 9, p. 1001–1011, 2011.

TAN, M.J.; OEHLER, R.L.; Lower Extremity Cellulitis and Bacteremia With *Herbaspirillum seropedicae* Associated With Aquatic Exposure in a Patient With Cirrhosis. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 13, p. 277-279, 2005.

TAN, Z.Q.; MEN, R.; ZHANG, R.Y.; HUANG, Z. First Report of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* Causing Mottled Stripe Disease on Sugarcane in China. **The American Phytopathological Society**, v. 94, p. 379, 2010.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.M.: *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.53, p.1979-1983, 2003.

WALL, D.; KAISER, D. Type IV pili and cell motility. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 1–10, 1999.

WANG, L.; MAKINO, S.; SUBEDEE, A.; BOGDANOVE, A. J. Novel candidate virulence factors in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as revealed by mutational analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 8023-8027, 2007.

WEBER, O.B.; CRUZ, L.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p. 201–205, 2001.

WEISS, V.; FAORO, H.; TADRA-SFEIR, M. Z.; RAITTZ, R. T.; SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A.; CARDOSO, R. L. A.; WASSEM, R.; CHUBATSU, L. S.; HUERGO, L. F. MÜLLER-SANTOS, M.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; CRUZ, L. M. Genome Sequence of *Herbaspirillum lusitanum* P6-12, an Endophyte Isolated Draft from Root Nodules of *Phaseolus vulgaris*. **J. Bacteriol.** v. 194, n. 15, p. 4136-4137, 2012.

WHITCHURCH, C. B.; HOBBS, M.; LIVINGSTON, S. P.; KRISHNAPILLAI, V.; MATTICK, J. S. Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria. **Gene**, v. 101, p. 33-44, 1991.

WHITCHURCH, C.B.; MATTICK, J.S. Characterisation of a gene *pilU* required for twitching motility but not phage sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol**, v. 13, p. 1079-1091, 1994.

WOLFGANG, M.; PARK, H. S.; HAYES, S. F.; VAN PUTTEN, J. P. M.; KOOMEY, M. Suppression of an absolute defect in type IV pilus biogenesis by loss-of-function mutations in *pilT*, a twitching motility gene in *Neisseria gonorrhoeae*. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 95, p. 14973–14978, 1998.

WOLFGANG, M.; PUTTEN, J.P.; HAYES, S.F.; DORWARD, D.; KOOMEY, M. Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. **Embo J.**, v. 19, p. 6408–6418, 2000.

XU, H.X.; WU, H.Y.; QIU, Y.P.; SHI, X.Q.; HE, G.H.; ZHANG, J.F.; WU, J.C. Degradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Herbaspirillum chlorophenolicum* from activated sludge. **Biodegradation**, v. 22, p. 335-345, 2011.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **J. Comput. Biol.**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

ZIGA, E.D.; DRULEY, T.; BURNHAM, C.D. *Herbaspirillum* Species Bacteremia in a Pediatric Oncology Patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 4320-4321, 2010.

## APÊNDICE 1

Apêndice 1. Região genômica de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 contendo o gene *pilT*.

```

      10      20      30      40      50      60      70
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
ACATTTCGACGCGCCAAGCAGGTATAGTAGACTCATTCGCTGGCGTCTCGCCAAACGCCGTCAATCAAG
      pilTE1F
      80      90     100     110     120     130     140
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
ACAAAAAGTGCTAACAAATCAGGTGGCTGAATGTCAAATGATCTTTTCTCGCCCGGGACCTGCAAAGAG
      ***
     150     160     170     180     190     200     210
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
AACTGCTGGCGCTTGTCAATTCTTCCCAGACGTTTTCGGATATCCATATCGAGCAGGATCAGCCGCTCAT
     220     230     240     250     260     270     280
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
GCTGAAGACGCGCGCGGGTGGCAGCCGGTGACGACATGCCGGTGGTGATCGAGCAGCTCGCGCCCCTG
     290     300     310     320     330     340     350
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
CTGTCGGCCATCGACGAAGACTGGGAAGACAAGATCATCGACGGCGCGCTCGATTGTCCCTATGTGTTGG
     360     370     380     390     400     410     420
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
GCGAATGGCGGCTACGCTGCAATATCTATCGCATGGCGCGCGGCAGCAAGGTGGCGGTGTCGATCCGCCG
      pilT E2 R
     430     440     450     460     470     480     490
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
CTTTCGGCTGGAACCGCTGGCGCTGGAACGCACGGGCCTGCCAGCTATGTCAAGACGGTGCTGGAAGCC
     500     510     520     530     540     550     560
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
ACCAAGGGCATCATCCTCGTCACGGGTCCGACGGGCGCGGGCAAGACCACGACGATCGCGTCGATGCTCG
     570     580     590     600     610     620     630
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
ACTATATCAACGCCCTCCCGCCGCGGCCACATCATCACCATCGAAGAGCCTATCGAATACGAATTGCAGCG
     640     650     660     670     680     690     700
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
CAAGCAGTCGATGATTTTCGCAAAAGGAAGTGCCGACCGATACCGAGAGCTTTTCTTCAGGCTTGCGCGAG
     710     720     730     740     750     760     770
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
GCGCTCAGGCAGAAGCCGGATGTGCTGATGGTGCGGCGAGATCCGCGATTTTCGACACGGCCGACACGGTCT
     780     790     800     810     820     830     840
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
TGACGCGCGCGAGTCAGGCCACCTGGTGCTGGCCACGCTGCACACCAGCAGCGCCGTGCGCGGATCAC
     850     860     870     880     890     900     910
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
CAAACCTGCTGGGCTTCTTTCCCCAGGAGCAGCGCGCCGAGCGCGCCACGCTGGCCGAAGCCCTGGTG
     920     930     940     950     960     970     980

```

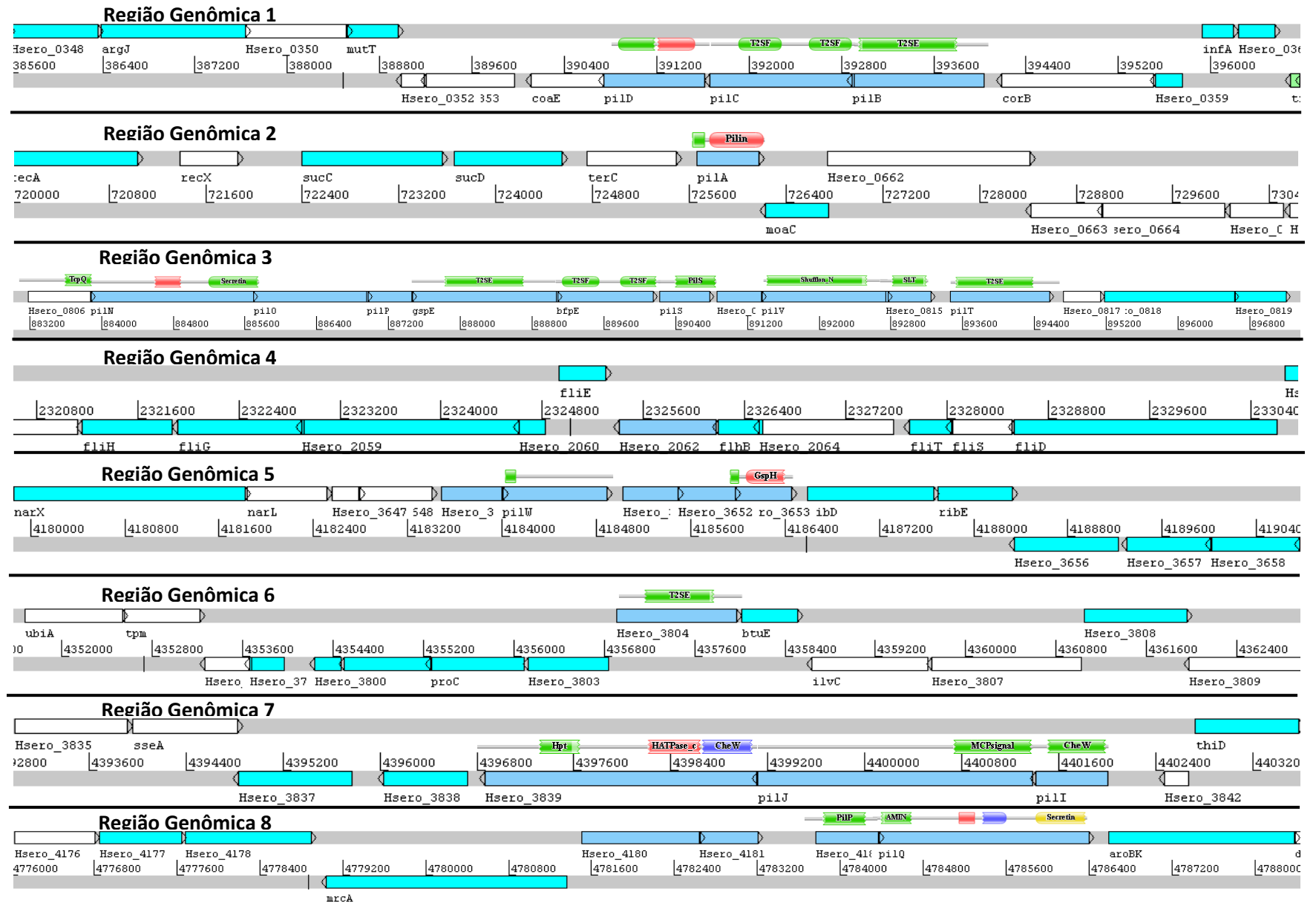
```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGCGTGATCTTCCAGAGCCTGTTGCCTTCCGAGGATGGCGAACACCATGTGATGGCCAGCGAGATGGTCT
      pilt E2 F
      990          1000          1010          1020          1030          1040          1050
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCAACAACAACCAAGCAGATCGCCGCCCTTCATCAGTGACCCGGCCAAGCTGCATCTGATCGGCGATTTTCA
      1060          1070          1080          1090          1100          1110          1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GAAGCGCAAGGAAGACAACATGTCGCGCAGCCTCAATGAAGTGCTGCTGCAACTGGTGACAAGAAGAGC
      1130          1140          1150          1160          1170          1180          1190
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTCTCGGCGCGCGATGCTTGGCGGGTGGCCTACAACCGGCTGGAATTGCACGAGATGCTCAACAGCGCCA
      1200          1210          1220          1230          1240          1250          1260
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AACGCTGATCCCGTTTTCATCGGACACAGGCCTGCACAGACGTTTCAGGCATCGACGACCTCGCAAGAGGT
***
      pilt E3 R

```

Região do genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (número de acesso no GenBank CP002039) entre as bases 893.366 a 894.663; região do gene *pilT* (Hsero\_0816) no fragmento de DNA mostrado: entre as bases 101 a 1.198 (1.098pb); Amarelo: fragmento A; Cinza: fragmento B; sublinhado: primers; Asteriscos: códon de início (ATG) e parada (TGA) do gene *pilT*.

## APENDICE 2



Esquema das oito regiões genômicas de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 que contém genes envolvidos no sistema pili tipo IV.